

**Die Bedeutung der Modulation zellulärer  
Sauerstoffsensoren für das Wachstum autochthoner  
Mammakarzinome in der Maus**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

**Anika Thiel**

geboren in Nordhorn

Institut für Physiologie  
der  
Universität Duisburg-Essen

**Dezember 2014**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2011 bis September 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Fandrey am Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 08. September 2015

Gutachter: Prof. Dr. Fandrey

Prof. Dr. Epple

Vorsitzender: Prof. Dr. Mayer

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) .....	1
1.1.1	Struktur von HIF-1 .....	1
1.1.2	Regulation von HIF-1 durch Hydroxylierung .....	2
1.1.3	Einfluss von NO auf den Sauerstoffsensor PHD .....	4
1.2	Die Tumorangiogenese .....	6
1.2.1	Aufbau und Funktion von Blutgefäßen .....	6
1.2.2	Die Neubildung von Blutgefäßen in Tumoren .....	8
1.2.3	Die Rolle von Stickstoffmonoxid im Tumor .....	11
1.3	Das Immunsystem während der Tumorentwicklung .....	13
1.3.1	Das angeborene und adaptive Immunsystem .....	13
1.3.2	Einfluss von NO auf das Immunsystem .....	15
2	Zielsetzung der Arbeit .....	16
3	Material und Methoden .....	17
3.1	Materialien .....	17
3.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	17
3.1.2	Verwendete Chemikalien .....	19
3.1.3	Puffer und Lösungen .....	21
3.1.4	Antikörper .....	21
3.1.5	cDNA-Synthese, PCR und quantitative Realtime-PCR .....	22
3.1.6	Oligonukleotide .....	23
3.1.7	Kommerzielle Kits .....	24
3.2	Tierexperimentelle Methoden .....	25

3.2.1	Tierhaltung und –zucht .....	25
3.2.2	Transgene Mausestämme.....	25
3.2.3	Genotypisierung.....	26
3.2.4	Experimenteller Verlauf der Versuchsreihe .....	27
3.3	Molekularbiologische Methoden .....	27
3.3.1	RNA-Isolierung aus Gewebe .....	27
3.3.2	cDNA-Synthese .....	28
3.3.3	PCR.....	29
3.3.4	Quantitative Realtime-PCR .....	30
3.3.5	Durchflusszytometrie.....	31
3.3.6	Bestimmung der Nitrit- und Nitratkonzentration im Serum.....	32
3.4	Histologische Methoden .....	32
3.4.1	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H & E) .....	32
3.4.2	Immunhistochemische Färbungen .....	33
3.5	Statistische Auswertung.....	35
4	Ergebnisse.....	36
4.1	Knockout-Effizienz in Tumoren der HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> -Mäusen .....	36
4.1.1	Steigerung des Nitrit/Nitrat-Levels nach Injektion von 80mg/kg KG DETA-NO im Serum.....	37
4.1.2	Nitrit und Nitratspiegel im Serum nach 4 h .....	38
4.2	Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -KO auf den Beginn des Tumorwachstums und Tumorgewicht....	39
4.2.1	Deletion von HIF-1 $\alpha$ in Brustepithelzellen beeinflusst nicht den Beginn des Tumorwachstums .....	39
4.2.2	Einfluss von HIF-1 $\alpha$ und NO auf das Tumorwachstum.....	39
4.2.3	Einfluss der HIF-1 $\alpha$ -Deletion auf die Blutgefäßentwicklung .....	42



4.3	Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf die Zielgenexpression .....	44
4.3.1	Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -KO und DETA-NO auf die HIF- und PHD-mRNA-Expression..	44
4.3.2	HIF-1 $\alpha$ -Knockout führt zu weniger Carboanhydrase IX in Tumoren .....	46
4.3.3	Unterschiedliche Auswirkungen des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts auf GLUT1 auf Proteinlevel und mRNA-Ebene .....	48
4.3.4	Weitere HIF-1 $\alpha$ -Zielgene.....	50
4.4	Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts auf Tumorsuppressorgene .....	51
4.5	Rolle der Metalloproteinasen .....	52
4.6	Gesteigerte Expression der Entzündungsfaktoren COX2 und FOXP3 mit DETA-NO- Behandlung .....	54
4.7	Einfluss des epithelialen HIF-1 $\alpha$ -KO und DETA-NO auf das Immunsystem .....	56
4.7.1	Rolle des angeborenen Immunsystems im Tumor .....	56
4.7.2	Rolle des adaptiven Immunsystems im Tumor .....	59
4.7.3	Einfluss von des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts und DETA-NO auf die sekundären lymphatischen Organe .....	61
5	Diskussion .....	71
5.1	Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf das Tumorwachstum .....	71
5.2	Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts auf das Immunsystem .....	76
6	Zusammenfassung .....	78
7	Literaturverzeichnis .....	81
8	Anhang.....	91
8.1	Versuchsreihe mit 10 mg/kg KG DETA-NO .....	91
8.1.1	Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts und 10 mg/kg KG DETA-NO auf den Beginn des Tumorwachstums .....	91

8.1.2	Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts und 10 mg/kg KG DETA-NO auf das Tumorgewicht .....	92
8.1.3	Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts und DETA-NO auf die Metastasierung in den Lungen.....	94
8.1.4	Abbildung einer Maus mit Tumoren .....	95
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	96
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	98
8.4	Tabellenverzeichnis.....	100
8.5	Publikationsliste .....	101
8.6	Lebenslauf .....	102
8.7	Erklärungen .....	103
8.8	Danksagung.....	104

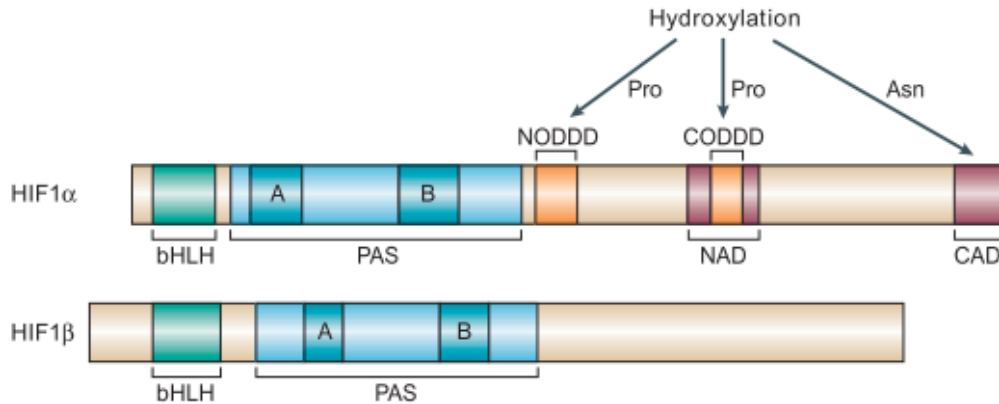
# 1 Einleitung

## 1.1 Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)

Um die Sauerstoffhomöostase aufrecht zu halten, haben höhere Eukaryonten spezielle Mechanismen entwickelt, um die O<sub>2</sub>-Aufnahme und Verteilung zu koordinieren. Das dafür notwendige respiratorische und zirkulatorische System ist in der Lage, auf Veränderungen der Sauerstoffverfügbarkeit systemisch, lokal oder auf zellulärer Ebene zu reagieren. Daher werden in fast allen Zellen der Säugetiere sauerstoffabhängige Signalwege exprimiert (Bruick 2003). Um die Sauerstoffhomöostase in einer sauerstoffarmen Umgebung wiederherzustellen, wird eine Reihe von Genen aktiviert, die der Kontrolle des Transkriptionsfaktorkomplexes Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) unterliegen.

### 1.1.1 Struktur von HIF-1

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer HIF-1 $\alpha$  und einer HIF-1 $\beta$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten bestehen aus einer *basic-helix-loop-helix* (bHLH)-Domäne und einer PER-ARNT-SIM (PAS)-Domäne (Wang et al., 1995). Diese beiden Domänen sind verantwortlich für die DNA-Bindung und Dimerisierung (Jiang et. al., 1996). Der bHLH-Abschnitt am N-Terminus von HIF-1 sorgt für die Bindung an das Hypoxie-responsive-Element (HRE) innerhalb regulatorischer DNA-Abschnitte, die PAS-Domänen dienen der Dimerisierung der beiden Untereinheiten (Abbildung 1.1). HIF-1 $\alpha$  besteht des Weiteren aus zwei Transkriptionsaktivierungsdomänen, der N-terminalen transaktivierenden Domäne (NAD) und der C-terminalen transaktivierenden Domäne (CAD). Die NAD überlappt mit der *Oxygen Dependent Degradation*-Domäne (ODDD), welche durch post-translationale Modifikationen die Stabilität der  $\alpha$ -Untereinheit reguliert (Huang et. al., 1998).



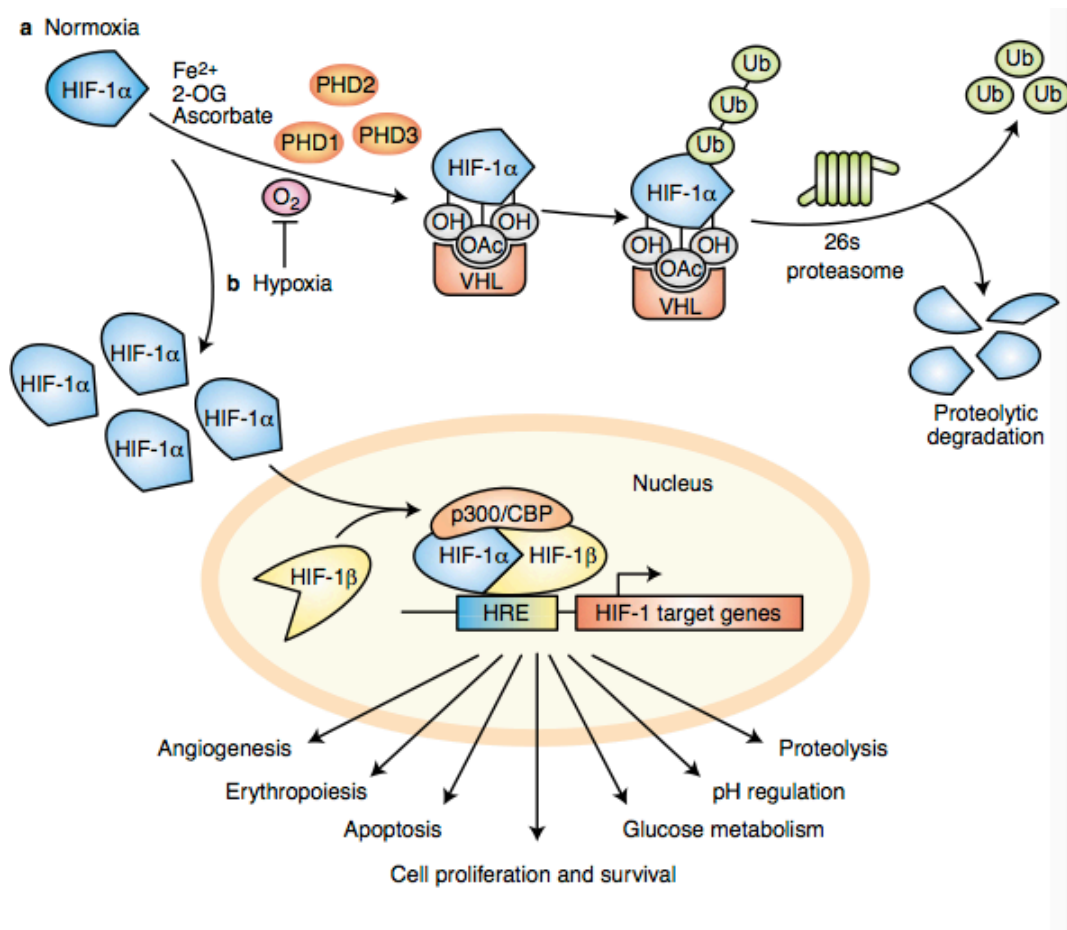
**Abbildung 1.1: Struktur von HIF-1α und HIF-1β.** HIF-1α besteht aus einer *basic-helix-loop-helix* (bHLH)-Domäne und einer PER-ARNT-SIM (PAS)-Domäne, sowie den N- und C-terminalen Oxygen Dependent Degradation-Domänen (NODDD, CODDD) und den transaktivierenden Domänen NAD und CAD. Die Stabilität der α-Untereinheit wird durch Protein-Wechselwirkungen mit NODDD, CODDD und CAD reguliert, welche dann die sauerstoffabhängige enzymatische Hydroxylierung in diesen Regionen auslöst. HIF-1β besteht ebenfalls aus einer bHLH- und einer PAS-Domäne, jedoch nur am C-Terminus gelegene transaktivierende Domäne (Schofield & Ratcliffe 2004).

### 1.1.2 Regulation von HIF-1 durch Hydroxylierung

HIF-α wird vorwiegend durch post-translationale Hydroxylierung, Acetylierung und Phosphorylierung reguliert. HIF-1α und HIF-1β werden in Zellen konstitutiv auf mRNA-Ebene exprimiert. Die Stabilität des HIF-1α-Proteins wird allerdings durch die Veränderungen des zellulären Sauerstoffgehalts reguliert. Unter Normoxie wird das HIF-1α-Protein schnell abgebaut, unter Hypoxie hingegen nimmt der Proteingehalt zu.

Der schnelle Abbau der α-Untereinheit unter normoxischen Bedingungen (s. Abbildung 1.2 a) beruht auf der Hydroxylierung zweier Prolin-Reste (Pro402 und Pro564 in humanem HIF-1α) in den ODD-Domänen (Masson et al. 2001; Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001). Zur Zeit sind drei Prolylhydroxylasen (PHD1, PHD2 und PHD3) bekannt, die abhängig von den Kofaktoren Eisen, 2-Oxoglutarat und Sauerstoff die Prolinreste hydroxylieren können (Epstein et al. 2001). Diese Hydroxylierung reguliert die Interaktion mit dem Tumorsuppressor von-Hippel-Lindau Protein (pVHL). pVHL ist ein Teil eines, aus mehreren Untereinheiten bestehenden, Ubiquitin-Ligase-Komplexes, welcher das hydroxylierte HIF-1α erkennt und für den proteasomalen Abbau mit Polyubiquitin markiert (Ohh et al. 2000; Maxwell et al. 1999).

Eine weitere Möglichkeit des proteasomalen Abbaus durch die Erkennung und Ubiquitinylierung durch pVHL stellt die Acetylierung von HIF-1 $\alpha$  an den Lysinrest 532 durch eine Acetyltransferase dar (Jeong et al. 2002). Der Asparaginrest (Asn803) in der CAD von HIF-1 $\alpha$  kann mithilfe der Asparaginhydroxylase, auch HIF-1-inhibierender Faktor FIH (*factor inhibiting HIF*) bezeichnet, ebenfalls hydroxyliert werden. Dies verhindert die Aktivierung der HIF-Zielgene durch Blockierung der Rekrutierung von transkriptionalen Koaktivatoren (p300/CBP), die nur an nicht hydroxyliertes Asparagin binden können (Lando et al., 2002; Mahon et al., 2001).



**Abbildung 1.2: HIF-1 $\alpha$ -Regulation durch Prolylhydroxylierung.** a: Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  durch die Prolylhydroxylasen (PHD1-3) in Anwesenheit von  $O_2$ ,  $Fe^{2+}$  und 2-Oxoglutarat (2-OG) sowie Vitamin C hydroxyliert. OH-HIF-1 $\alpha$  wird dann von pVHL erkannt und ubiquitinyliert (Ub), sodass Polyubiquitin-OH-HIF-1 $\alpha$  in den Proteasomen abgebaut werden kann. Die Acetylierung (OAc) von HIF-1 $\alpha$  fördert ebenso die Bindung zu pVHL. b: Unter Hypoxie ist Prolylhydroxylierung inhibiert. HIF-1 $\alpha$  wird durch pVHL nicht erkannt und somit auch nicht für den proteasomalen Abbau ubiquitinyliert. HIF-1 $\alpha$  kann akkumulieren und transloziert in den Nukleus, wo dann die Dimerisierung

mit HIF-1 $\beta$  stattfindet. Der HIF-1-Komplex interagiert mit den Koaktivatoren p300 und cAMP-bindendes Protein (CBP), bindet an das Hypoxie-responsive-Element (HRE) und aktiviert die HIF-1-Zielgene (Carroll & Ashcroft 2005).

Unter Hypoxie ist die Prolylhydroxylierung aufgrund des fehlenden Sauerstoffs inhibiert. pVHL ist nun nicht in der Lage HIF-1 $\alpha$  zu erkennen und für den proteasomalen Abbau zu ubiquitinylieren. Daher kann HIF-1 $\alpha$  akkumulieren und im Nukleus mit HIF-1 $\beta$  dimerisieren. Das Dimer interagiert mit den Koaktivatoren p300 und CBP und bindet an das Hypoxie-responsive Element (HRE), um so die Zielgene zu aktivieren (Abbildung 1.2 b).

### 1.1.3 Einfluss von NO auf den Sauerstoffsensor PHD

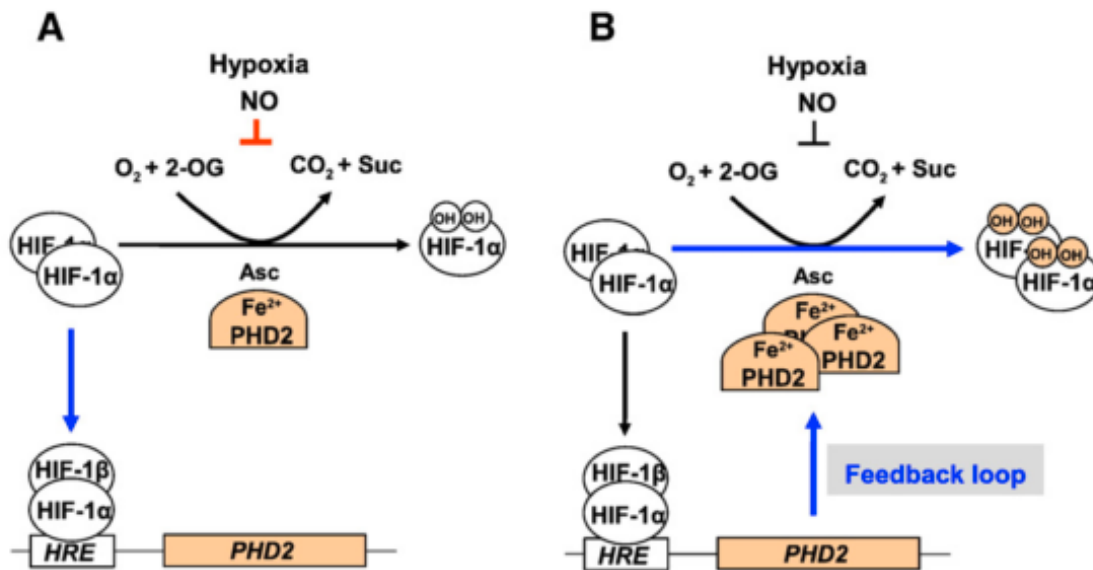
Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Stickstoffmonoxid (NO) die Zellantwort auf Hypoxie durch die Regulation von HIF-1 in zweifacher Weise modulieren kann. In der Zellkultur konnte nachgewiesen werden, dass chemisch unterschiedliche NO-Donatoren und eine durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) gesteigerte NO-Bildung die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen induzieren können (Frede et al. 2007; Kimura et al. 2000; Palmer et al. 2000; Sandau et al. 2001; Metzen et al. 2003) und so durch Nachahmung der hypoxischen Antwort HIF-1 $\alpha$  und HIF-1-Zielgene induzieren.

Metzen et al. (2003) zeigten, dass die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation durch NO unabhängig von der HIF-1 $\alpha$  Gentranskription und Proteintranslation ist. Die Akkumulation des HIF-1 $\alpha$  tritt durch die Hemmung seines Abbauweges, nämlich der direkten Inhibition der PHD1-3 ein, wobei *in vivo* hauptsächlich die PHD2 gehemmt wird.

Die molekularen Mechanismen der PHD-Hemmung sind zur Zeit noch nicht ausreichend untersucht, aber von anderen Nichteisen(II)-Enzymen ist bekannt, dass NO anstatt des Sauerstoffs direkt an das Eisen-Ion an der katalytischen Seite binden kann (Roach et al. 1995; Arciero et al. 1985; Hegg & Jr 1997). Ebenso kann die FIH-1 durch NO gehemmt werden, wenn die Verfügbarkeit der Kofaktoren Eisen und Vitamin C limitiert ist (Park et al. 2008).

Unter hypoxischen Konditionen scheint NO eine bimodale Wirkung auf die HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und Zielgenaktivierung zu haben (Abbildung 1.3). In der frühen Phase der Hypoxie oder NO-Wirkung wird die PHD2 gehemmt und das HIF-1 $\alpha$ -Protein stabilisiert,

ebenso die HIF-1-Aktivität und die damit verbundene Expression des HIF-1-Zielgens PHD2 (Berchner-Pfannschmidt et al. 2007). In der späten Phase der Hypoxie oder NO-Wirkung ist der PHD2-Proteingehalt erhöht; dies führt zu einer verminderten HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und HIF-1-Transkriptionsaktivierung (Sogawa et al. 1998; Liu et al. 1998; Huang et al. 1999).



**Abbildung 1.3: Bimodaler Effekt von NO auf den Sauerstoffsensor PHD2.** Die PHD2 ist das Schlüsselenzym im Sauerstoffsensing des HIF-1-Signalweges. PHD2 ist ein HIF-1-Zielgen und Teil einer negativen Rückkopplungsschleife. A: Unter Hypoxie und/oder NO ist die PHD2 gehemmt, HIF-1 $\alpha$  wird nicht hydroxyliert, akkumuliert und die HIF-1-abhängige Expression der PHD2 wird induziert. B: Unter länger andauernden Hypoxie und/oder NO endet die HIF-1-abhängige PHD2-Expression in einer Rückkopplungsschleife. Ein erhöhter PHD2-Proteingehalt steigert die PHD2-Aktivität, was zu vermehrter HIF-1 $\alpha$ -Hydroxylierung und Degradation führt (Berchner-Pfannschmidt et al. 2010).

## 1.2 Die Tumorangiogenese

### 1.2.1 Aufbau und Funktion von Blutgefäßen

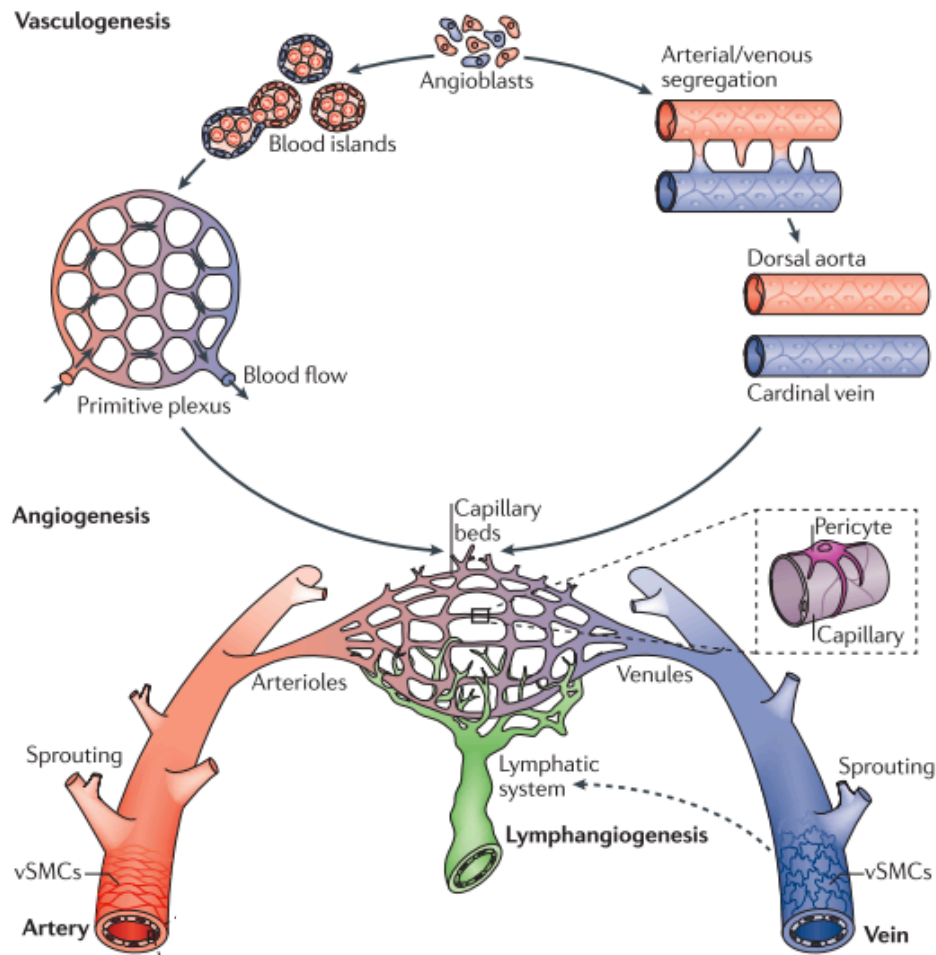
Blutgefäße liefern Sauerstoff und Nährstoffe, ebenso Blut- und Immunzellen zu allen Organen und Zellen des Körpers und sorgen für den Abtransport der Stoffwechselprodukte. Die Blutgefäße bilden zusammen mit dem Herzen den Blutkreislauf und regulieren die Blutzirkulation im Körper. Es gibt drei Arten von Blutgefäßen; Arterien transportieren das Blut vom Herzen weg, Venen führen zum Herzen hin. Die Kapillaren verbinden über Arteriolen und Venolen Arterien und Venen. Durch die Kapillarwände findet der Austausch von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselprodukte statt.

Der allgemeine Wandaufbau von Blutgefäßen besteht aus drei Gewebeschichten (*Tunicae*), die sich jedoch in ihrer Zusammensetzung in Arterien und Venen unterscheiden.

Die innerste Gewebeschicht besteht aus flachen Endothelzellen, welche auf der Basalmembran liegen und zusammen die *Tunica interna* bilden. Die mittlere Schicht, *Tunica media* ist aus glatten Muskelzellen, Kollagen und elastischen Fasern aufgebaut und grenzt an die *Tunica adventitia*, bestehend aus Fibroblasten, Kollagen und einer elastischen Lamina. Diese Schicht verbindet die Gefäße mit dem umliegenden Gewebe.

Während der Embryonalentwicklung differenzieren aus mesodermalen Zellen endotheliale Vorläuferzellen, sog. Angioblasten. Diese sind in der Lage die ersten embryonalen Blutgefäße, die dorsale Aorta und die Kardinalvene zu bilden. Angioblasten bilden Blutinseln, welche sich zu einem primitiv verzweigten Netzwerk aus arteriellen und venösen Blutgefäßen verbinden. Im Anschluss an die Vaskulogenese folgt die „sprossende“ Angiogenese. Die dorsale Aorta, Kardinalvene und das vaskuläre Geflecht bilden ein komplexes hierarchisches Netzwerk aus Arterien und Arteriolen, Venen und Venolen sowie Kapillaren. Die anschließende Rekrutierung von muralen Zellen, wie Perizyten und glatten Muskelzellen (*vascular smooth-muscle cells*, vSMCs) stabilisiert die neu entstehenden Gefäße und fördert die Gefäßreifung. Durch das Ausbreiten von lymphatischen Endothelzellen von venösen Gefäßen (Lymphangiogenese) entsteht das Lymphsystem (Carmeliet & Jain 2011; Jain 2003; Risau & Flamme 1995).





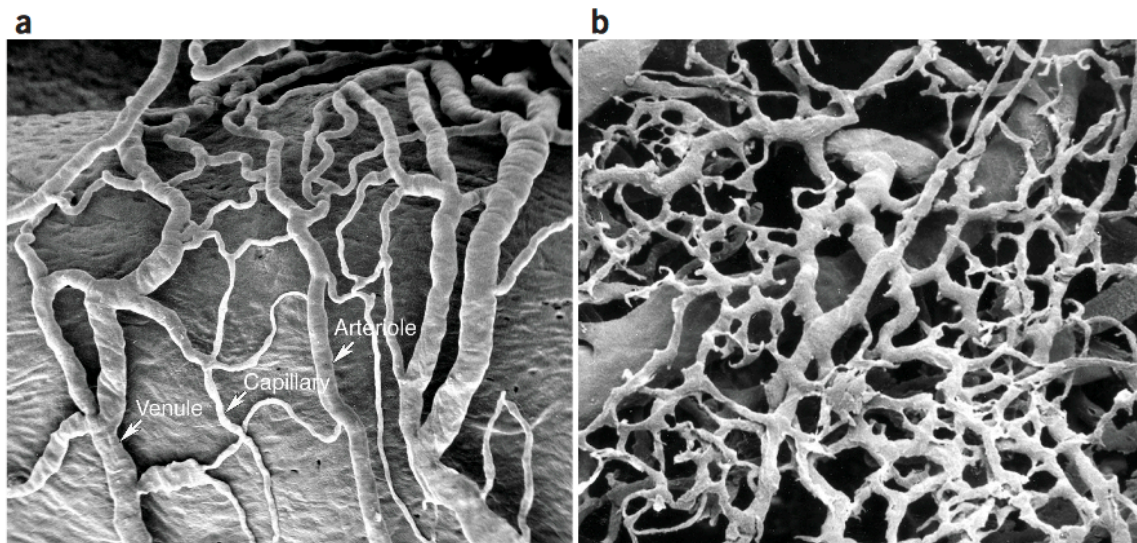
**Abbildung 1.4: Neubildung von Blutgefäßen.** Oben: Vaskulogenese: Neubildung von Blutgefäßen während der embryonalen Entwicklung. Unten: Angiogenese: Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Netzwerken aus Blutgefäßen (Herbert & Stainier 2011).

Die Neubildung von Gefäßen ist im adulten Organismus auf einige physiologische Prozesse begrenzt, die wie etwa bei der Wundheilung und des Reproduktionszyklus. Änderungen in lokalen metabolischen und mechanischen Mikroumgebung, wie Hypoxie, niedriger pH-Wert, anormaler hydrostatischer Druck oder Scherspannung beeinflussen ebenso die Formation, Reifung und Umorganisation von kleinen und großen Gefäßen und sind ein Teil von normalen physiologischen Prozessen (Jain 2003). Daneben existieren auch pathologische Prozesse, die mit einer insuffizienten Angiogenese einhergehen, wie z.B. Alzheimer, Diabetes oder Morbus Crohn (Carmeliet & Jain 2000) oder einer anormalen bzw. exzessiven Angiogenese, wie sie beim Wachstum von soliden Tumoren und Metastasierung vorkommt (Folkman 1971).

### 1.2.2 Die Neubildung von Blutgefäßen in Tumoren

In etwa 90 % aller bekannten Krebserkrankungen liegen solide Tumore vor (Brown 2000). Sie entwickeln sich aus einer mutierten Zelle und führen zu signifikanter Morbidität und Mortalität entweder durch Invasion in normales Gewebe oder durch Metastasierung in lebenswichtige Organe, wie z. B. Lunge, Leber oder Gehirn. Der Prozess der Tumorprogression (Proliferation, lokale Invasion, Metastasierung) ist durch schnelles Zellwachstum in Zusammenhang mit Veränderung des Mikromilieus der Tumorzelle umgebenden Gewebes charakterisiert. Ein bedeutender Anteil an den Veränderungen des Tumor-Mikromilieus ist die unzureichende Sauerstoffversorgung und die daraus resultierende Hypoxie (Vaupel et al. 1989; Ryan et al. 2000). Ab einem Tumordurchmesser von etwa 1 mm, kann der Sauerstoff- und Nährstoffbedarf nicht mehr durch Diffusion aus dem umliegenden Gewebe gedeckt werden. Daher müssen Tumore ihr eigenes Netzwerk von Gefäßen zur Versorgung aufbauen. Dies geschieht entweder durch den Einbau bereits vorhandener Gefäße oder durch Bildung von neuen Gefäßen durch den Einfluss von Faktoren der Tumorangiogenese (Vaupel et al. 1989; Folkman 1990; McDougall et al. 2006).

Das neu gebildete Gefäßnetz unterscheidet sich sowohl strukturell als auch funktionell stark von normalen Blutgefäßen (Abbildung 1.5 ).



**Abbildung 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines normalen und tumorösen Blutgefäßgeflechts.** a: Organisiertes Netzwerk aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen in gesundem

Gewebe. b: Chaotische Tumorgefäße. Die normale Gefäßhierarchie von Arteriolen, Kapillaren und Venolen ist weitgehend nicht vorhanden (McDonald & Choyke 2003).

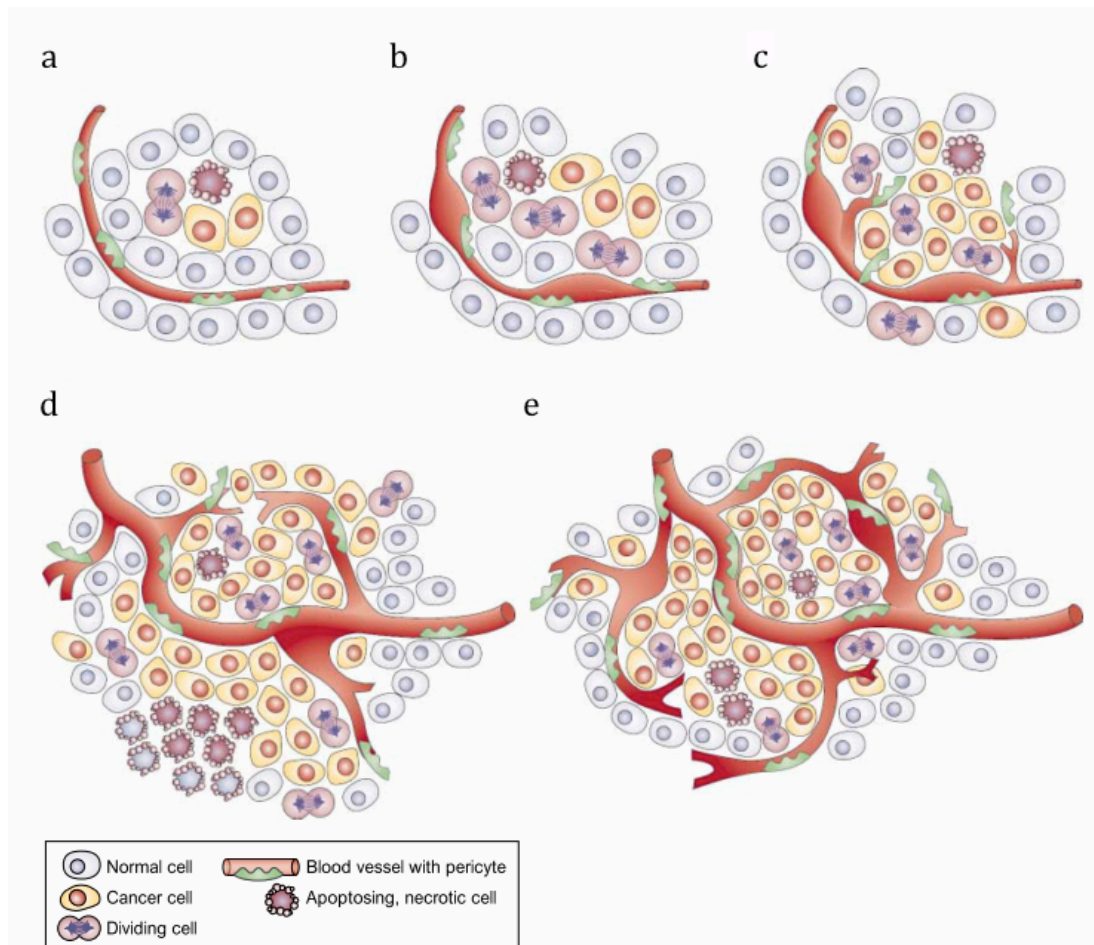
Die tumorösen Blutgefäße sind unregelmäßig geformt, erweitert, gewunden und können in Sackgassen enden. Sie sind nicht in reife Arteriolen, Venolen und Kapillaren differenziert und nehmen Eigenschaften von unreifen Gefäßen an. Das vaskuläre Netzwerk in Tumoren ist häufig undicht und löst Blutungen aus (Hämorrhagie). Perivaskuläre Zellen, die normalerweise im engen Kontakt mit dem Endothel stehen, sind lose oder weniger häufig. Dies und Unterbrechungen der Basalmembran führen zu einer Instabilität und höheren Permeabilität und damit zu einem unregelmäßigen, teils langsameren Blutfluss in den Tumorgefäßen (Benjamin et al. 1999; Morikawa et al. 2002; Folberg et al. 2000; McDonald et al. 2000). Die Tumorangiogenese ist, wie die physiologische Angiogenese (vgl. Kapitel 1.2.1) durch verschiedene pro- und antiangiogene Faktoren geregelt. Einige Faktoren sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

**Tabelle 1.1: Pro- und antiangiogene Faktoren.**

Proangiogene Faktoren	Antiangiogene Faktoren
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Angiostatin
Epidermal growth factor (EGF)	Canstatin
Fibroblast growth factors (FGFs)	Endostatin
Angiopoietin-1/2 (Ang-1/2)	Thrombospondin-1
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Tumstatin
Matrixmetalloproteinasen (MMPs)	Carboanhydrase-9 (CAIX)
Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)	
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	

Die physiologische Angiogenese unterliegt einer Balance aus pro- und antiangiogenen Faktoren. In der Tumorentstehung gerät diese aus dem Gleichwicht. Der sogenannte *angiogenic switch* beschreibt den Übergang von avaskulären zu vaskulären Tumoren aufgrund der vermehrten Freisetzung von proangiogenen Faktoren. Dieser Übergang kann in verschiedenen Stadien der Tumorprogression auftreten. Die meisten Tumore beginnen als

avaskuläre (ruhende) Knötchen (Abbildung 1.6 a). Der *switch* beginnt mit der Freisetzung von wachstumsfördernden Faktoren wie z.B. VEGF, welcher eine Gefäßerweiterung und erhöhte Permeabilität der Wirtsgefäße vermittelt, und mit der Angiopoetin-2 vermittelten Ablösung der Perizyten-schicht (Abbildung 1.6 b). Nach dem Abbau der Basalmembran und extrazellulärer Matrix durch Matrixmetalloproteinasen (Kalluri 2003) schließt sich die „sprossende“ Angiogenese an (Abbildung 1.6 c); die durch z. B. PDGF-vermittelte Rekrutierung von perivaskulären Zellen führt zur Bildung neuer Blutgefäße (Abbildung 1.6 d). Der Tumor wächst solange weiter, wie die Blutgefäße die hypoxischen und nekrotischen Areale des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen können (Abbildung 1.6. e) (Bergers & Benjamin 2003).

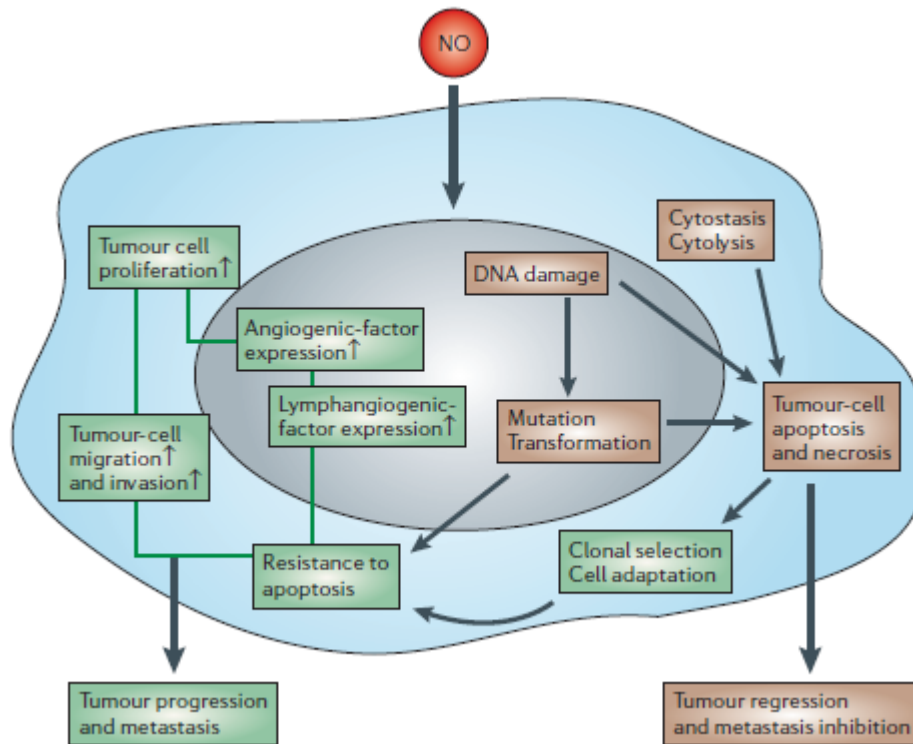


**Abbildung 1.6: Gefäßneubildung im Tumor – *angiogenic switch*.** a: avaskuläre Knötchen b: Ablösung der Perizyten-schicht und Vasodilatation c: „sprossende“ Angiogenese d: Bildung neuer reifer Blutgefäße e: Integration an bestehende Blutgefäße (nach Bergers & Benjamin 2003).

### **1.2.3 Die Rolle von Stickstoffmonoxid im Tumor**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses Gas, welches im Körper aus der Aminosäure L-Arginin durch die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) synthetisiert wird. Drei Isoformen der NOS wurden bis jetzt identifiziert: die endotheliale NOS (eNOS) und neuronale NOS (nNOS) sind Calcium/Calmodulin-abhängig und werden konstitutiv exprimiert. Die induzierbare Isoform (iNOS) ist Calcium/Calmodulin-unabhängig und wird durch inflammatorische Cytokine oder Bakterien induziert. NO, welches konstitutiv in geringen Mengen durch eNOS und nNOS produziert wird, ist ein Mediator in physiologischen Prozessen, wie Vasodilatation, Inhibition von Blutplättchenaggregation und Neurotransmission. Große NO-Mengen, wie sie z. B. durch die iNOS entstehen, können antibakterielle und antitumorale Effekte vermitteln. Eine chronisch erhöhte NO-Bildung soll jedoch zu vielen pathologischen Prozessen wie Entzündungen oder Krebs beitragen (Moncada & Higgs 1993; Knowles & Moncada 1994).

In der Literatur werden NO und seinen Metaboliten in der Tumorbilogie sowohl pro- als auch antitumorale Effekte zugeschrieben. NO fördert die Tumorprogression durch direkte Induktion der Tumorzellproliferation, -migration und -invasion, indirekt durch die Expression angiogenetischer und lymphangiogenetischer Faktoren (Fukumura et al. 2006). Auf der anderen Seite stehen die zytotoxischen Effekte durch hohe NO-Level, welche zu DNA Schäden, Genmutationen und dem Zelltod führen und somit zu Tumorregression und Inhibierung der Metastasierung führen können (s. Abbildung 1.7).



**Abbildung 1.7: Mechanismen von NO in einem Tumor.** NO kann sowohl die Metastasierung und Tumorprogression begünstigen (grüne Kästchen) als auch die Metastasierung inhibieren und zur Tumorregression führen (braune Kästchen) (Fukumura et al. 2006).

### 1.3 Das Immunsystem während der Tumorentwicklung

Das Immunsystem setzt sich aus vielen Zelltypen und Mediatoren zusammen, die miteinander und mit Nicht-Immunzellen in komplexen und dynamischen Netzwerken interagieren, um den Schutz vor körperfremden Stoffen, Pathogenen und entarteten Zellen, wie z.B. Tumorzellen, zu gewährleisten. Das Immunsystem besteht aus zwei verschiedenen, jedoch nicht trennbaren, Kompartimenten: der angeborenen (unspezifischen) und der adaptiven (spezifischen) Immunantwort.

#### 1.3.1 Das angeborene und adaptive Immunsystem

Die angeborenen Immunzellen, wie dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, Neutrophile, Basophile, Eosinophile und Mastzellen sind die erste Verteidigungslinie gegen körperfremde Substanzen und Krankheitserreger. Bei gestörter Gewebe-Homöostase senden Makrophagen und Mastzellen sofort lösliche Mediatoren wie Cytokine, Chemokine, proangiogene Faktoren, matrixremodulierende Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aus. Ebenso werden bioaktive Mediatoren, wie z. B. Histamin mobilisiert, die die Bereitstellung und Infiltration von Leukozyten in das geschädigte Gewebe, initiieren.

DCs bilden die Schnittstelle zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem und sind im Wesentlichen antigenpräsentierende Zellen. Sie erkennen fremde Strukturen und präsentieren diese als Peptide auf der Zelloberfläche der MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Komplexen, anschließend wandern sie in die sekundären lymphatischen Organe, wo sie ihre MHC-I- bzw. MHC-II-Peptid-Komplexe den T-Zellen präsentieren und diese dadurch aktivieren (Banchereau & Steinman 1998; Fernandez et al. 1999).

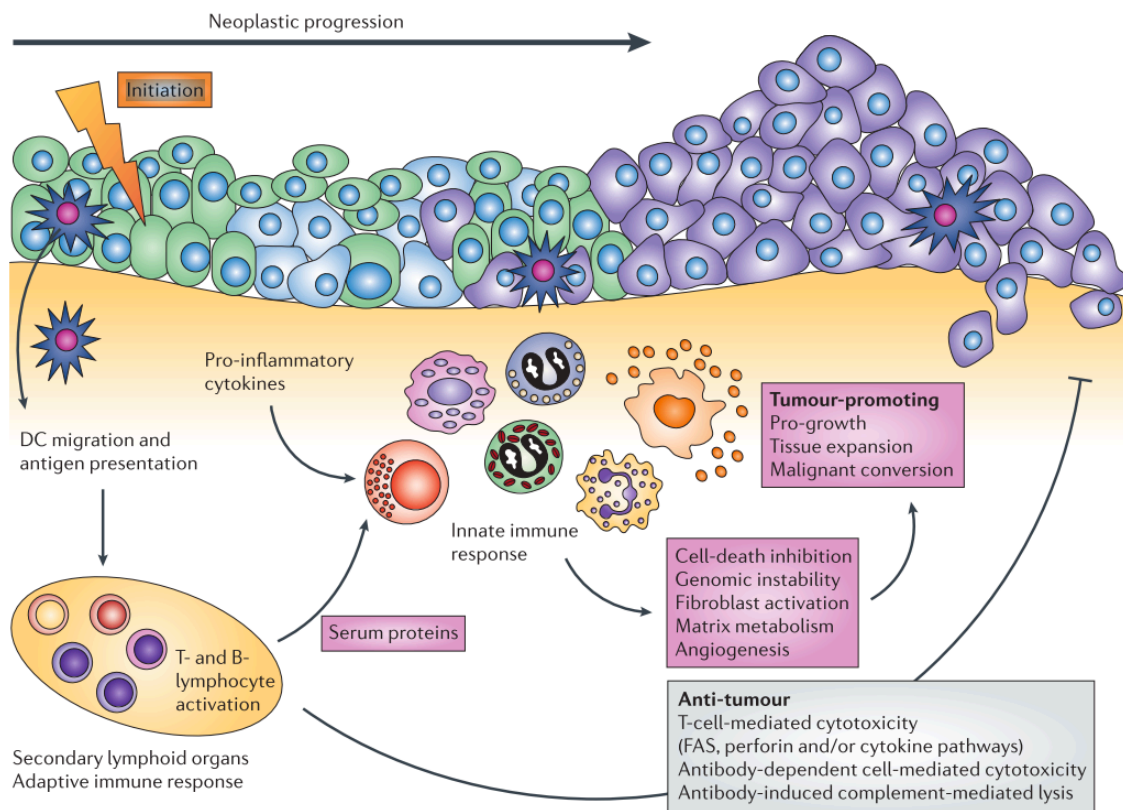
NK-Zellen sind ebenfalls in der Lage zwischen den angeborenen und adaptiven Immunzellen zu vermitteln, da sie bidirektional mit den DCs interagieren. Bestimmte NK-Zell-Subtypen sind der Lage, unreife DCs zu beseitigen, andere fördern ihre Reifung. Ebenso können DCs die Aktivierung von NK-Zellen regulieren (Raulet 2004; Hamerman et al. 2005).

Die akute Aktivierung einer primären effizienten adaptiven Immunantwort erfordert die direkte Wechselwirkung mit reifen Antigen-präsentierenden Zellen. Zu den adaptiven



Immunzellen zählen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen). T-Helferzellen erkennen über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor Antigene, die auf MHC-II-Komplexen und zytotoxische T-Zellen erkennen Antigene, die durch MHC-I-Komplexe dargeboten werden (Pardoll & Topalian 1998).

Die adaptiven Immunzellen können direkt durch antitumorale zytotoxische-T-Zell-Aktivität oder durch Cytokin-vermittelte Lyse der Tumorzellen das Tumorwachstum hemmen. Im Gegensatz dazu fördern regulatorische T-Zellen, welche die antitumorale T-Zell-Antwort unterdrücken, das Tumorwachstum (Onizuka et al. 1999; Shimizu et al. 1999).



**Abbildung 1.8: Zusammenspiel angeborener und adaptiver Immunzellen während der Tumorentwicklung.** Im neoplastischen Gewebe werden Antigene durch Dendritische Zellen in die sekundären lymphatischen Organe transportiert und dadurch das adaptive Immunsystem aktiviert, welches sowohl pro- als auch antitumorale Effekte auslöst. Die Aktivierung von B-Zellen und die humorale Immunantwort führen zu einer chronischen Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Aktivierte angeborene Immunzellen fördern das Tumorwachstum, indem sie proangiogene Faktoren und extrazelluläre Proteasen produzieren. Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt zur einer antitumorale Antwort, durch z.B. T-Zell-vermittelte Toxizität oder Antikörper-induzierte Lyse (de Visser et al. 2006).



### **1.3.2 Einfluss von NO auf das Immunsystem**

NO nimmt mehrere Rollen im Immunsystem ein. Es wirkt toxisch gegen infektiöse Organismen (Hibbs et al. 1987; Liew et al. 1991), als Induktor oder Suppressor der Apoptose (Kröncke et al. 2001) oder Immunregulator (Coleman 2001). Grundsätzliche Überlegungen deuten darauf hin, dass in der Immunantwort die iNOS hauptverantwortlich ist (Robbins et al. 1994). Viele Zellen exprimieren iNOS, einschließlich Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen (Bogdan et al. 2000; Langrehr et al. 1993), Monozyten/Makrophagen, Antigen-präsentierende Zellen (van der Veen 2001) und natürliche Killerzellen (Cifone et al. 2001). Ob T-Lymphozyten (Wei et al. 1995; Taylor-Robinson et al. 1994) Mastzellen (Forsythe et al. 2001; Bidri et al. 2001; Eastmond et al. 1997) und Neutrophile (Armstrong 2001) immunologisch wirksames NO produzieren, ist bisher umstritten. NO kann Immunzellen ebenso regulieren. In den meisten Fällen wirkt NO inhibitorisch auf die Zellfunktion und das Wachstum, unter bestimmten Voraussetzungen kann es aber auch antiapoptotische Effekte auslösen (Kröncke et al. 2001). In niedrigen Konzentrationen, die etwa die Apoptose induzieren, hemmt NO das T-Zell-Wachstum. T-Zellen reagieren empfindlich auf kleine Änderungen im NO-Gehalt, was darauf hindeutet, dass NO ein „on-off“-Schalter für die Proliferation ist (van der Veen 2001).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

In schnell wachsendem Tumorgewebe, wie dem des Mammakarzinoms, entsteht Hypoxie. In der Anpassung von Geweben an Hypoxie spielt der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) eine Schlüsselrolle (Stockmann & Fandrey 2006). Der Gehalt an HIF-1 wird durch die Sauerstoffsensoren Prolylhydroxylasen (PHDs) reguliert. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Hydroxylierung der  $\alpha$ -Untereinheit des HIF-1 durch die PHD2 inhibiert und HIF-1 $\alpha$  kann akkumulieren und so mit HIF-1 $\beta$  die hypoxische Genexpression induzieren. In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an PHD2 durch Stickstoffmonoxid variiert werden kann. Gleichzeitig steigt die spezifische Aktivität der PHD2, so dass NO in der Lage ist den zellulären Sauerstoffsensor in seinem Gehalt und seiner Funktion zu modulieren (Berchner-Pfannschmidt et al. 2010).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit sich die *in vitro* Ergebnisse auf ein autochthones Tumormodell der Maus übertragen lassen. Es wird ein transgenes Mausmodell verwendet, welches spontan und orthotop Brusttumore entwickelt. Zudem weist ein Genotyp von Mäusen einen konditionellen HIF-1 $\alpha$ -Knockout in den Brustepithelzellen auf. Durch regelmäßige Behandlung mit dem NO-Donor DETA-NO soll festgestellt werden, ob sich das Tumorstadium und der Aufbau des Tumors regulieren lässt. Mögliche Unterschiede im Beginn des Tumorstadiums soll die frühzeitige Palpation der Brustdrüsen zwischen den verschiedenen Genotypen sowie behandelten und unbehandelten Tieren aufzeigen. Bei Versuchsende werden die Tumore und die Lunge entnommen und auf Tumorstadium, Vaskularisation und Metastasen untersucht.

Überdies soll untersucht werden, ob und wie weit der epitheliale HIF-1 $\alpha$ -Knockout unter Behandlung mit NO Einfluss auf das Immunsystem, ein wesentlicher Bestandteil des Tumormikromilieus, nimmt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.1: Verwendete Geräte und Hersteller.**

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Absaugpumpe	Schuett (Biotek)
Analysewaage	Pioneer (Ohaus)
Ausgießstation	Shandon Histocentre 2 Embedding Center (Thermo Scientific)
Autoklav	Varioklav (Thermo Scientific)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Hera Cell 240 (Thermo Scientific)
Durchflusszytometer	CANTO II Flow Cytometer (Becton Dickinson)
Feinwaage	Ken GS (Satorius)
Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsystem	Fusion- FX7 (Peglab)
Mikroskop	Axiovert 200M (Zeiss)
Gewebeeinbettautomat	Shandon Excelsior ES Tissue Processor (Thermo Scientific)
Horizontales Elektrophoresesystem	hausinterne Anfertigung
Kamerasystem	Nikon DS Ri1
Kühlplatte	Microm EC 350-2 (Thermo Scientific)
Magnetrührer	KMO2 (TKA)
Manuelle Pipetten (10, 100, 1000 µL)	Eppendorf
Mikrotom	Microm HM 340 E (Thermo Scientific)
Millipore-System	TKA-Micro (TKA)
Paraffin-Streckbad	Tissue Flotation Bath TFB 45 (Medite)
PCR-Gerät	Mastercycler (Eppendorf), Thermocycler Tpersonal, Tprofessional (Biometra)
pH-Meter	Eutech Instruments
Photometer	Epoch (Biotek)

Pipettierhilfe	accu-jet® pro (Brand)
Plattform- /Heizschüttler	Polymax 1040 (Bio-Rad)
Präparationsbesteck	Aesculap
Realtime PCR-Gerät	CFX96 Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
Sterile Werkbank	HERAsafe (Heraeus)
UV-Geldokumentationsanlage	BioDoc-It™ Imaging System (UVP)
Vortexer	Select (Bioproducts)
Zählkammer	Neubauer (Ratiomed)
Zentrifugen	Centrifuge 5414D/5414R (Eppendorf); Biofuge fresco, Labofuge 400 R (Heraeus Instruments); Sorvall Centrifuge fresco (Thermo Scientific)

**Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
96 Fast PCR-Platte Vollrand	Sarstedt
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt
Amicon® Ultra – 0,5 ml Centrifugal Filters Ultracel® - 10K	Millipore
Deckgläser	Engelbrecht
Einmalspritzen (2 ml; 5 ml; 10 ml)	Terumo
Filter Tips, steril (10 µl, 100 µL, 1000 µl)	Greiner bio-one
Kanülen (20G x 1½“, 27G x ¾“)	BD Microlane™ 3 Becton Dickinson
Microtome Blade S35	Feather
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	Brand GmbH und Co KG
Mikroplatte 96-well, Rundboden	BD Falcon
PCR SingleCap 8er-Softstrips 0,2 ml	Biozym
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µL, 1000 µl)	Sarstedt
Plastikpipetten, steril (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one
PP-Schraubverschluss Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf

Rotilabo®-Einbettkassetten	Roth
Safe-Lock Tubes (0,5 ml)	Eppendorf
Spritzen Micro-Fine™ U-40 Insulin (0,33 mm (29G) x 12,7 mm)	Becton, Dickinson and Company
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck
Zellkulturplatte, steril (6- und 96-well)	Greiner bio-one
Zellsiebe (40 µm, 70 µm)	Falcon Becton Dickinson

---

### 3.1.2 Verwendete Chemikalien

**Tabelle 3.3: Verwendete Chemikalien.**

Bezeichnung	Hersteller
100 bp DNA Ladder	Invitrogen
Aceton	Sigma
Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma
DETA-NONOate (DETA-NO)	Enzo Life Science
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco
Entellan®	Merck
Eosin Y Lösung, wässrig	Sigma
Essigsäure (100 %)	Fluka
Ethanol (EtOH)	Roth
Ethidiumbromid-Lösung 0,07 %	Applichem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Forene® 100 % (v/v)	Abbott
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Guanidinthiocyanat (GTC)	Roth
Isopropanol	Sigma
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem

Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Kollagenase (Type III)	Worthington
Methanol ( $\text{MeOH}$ )	Sigma
Meyers Hämalaunlösung	Merck
Natriumacetat ( $\text{NaOAc}$ )	Sigma
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Roth
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Fluka
Natriumfluorid ( $\text{NaF}$ )	Fluka
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Fluka
Normal Goat Serum (NGS)	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Phenol	Applichem
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Applichem
Pimonidazol	HPI
Salzsäure 37 % ( $\text{HCl}$ )	Fluka
Target Retrieval Solution (10x)	Dako
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tris-Base	Applichem
Tris-HCl	Roth
Tryptanblau	Merck
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Merck
Xylol	Roth

---

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde für die Puffer und Lösungen Millipore-H<sub>2</sub>O verwendet. Die nicht aufgeführten Puffer waren Bestandteil von kommerziellen Kits.

**Tabelle 3.4: Puffer und Medien.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACK-Puffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM EDTA, pH = 7,2-7,4
DEPC-H <sub>2</sub> O	500 ml H <sub>2</sub> O, 0,5 ml DEPC, 1 h bei RT rühren, autoklavieren
FACS-Puffer	1x PBS, 0,1 % FCS, 0,02 % NaN <sub>3</sub>
Lysepuffer	DMEM, 0,2 % (w/v) Kollagenase Type III, 1 U/ml DNase I
Lyse-Stopp-Puffer	DMEM, 10 % FCS
PBS (1x)	138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 7,4
PBS-T	1x PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20
TAE (1x)	40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH = 8,0
TBS (1x)	138 mM NaCl, 20 mM Tris-Base, pH = 7,6
TBS-T	1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween 20

### 3.1.4 Antikörper

**Tabelle 3.5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper. DZ: Durchflusszytometrie; IF: Immunfluoreszenz; ICH: Immunhistochemie; WB: Western Blot.**

Primärantikörper	Typisierung	Hersteller	Verdünnung
anti-CAIX	Kaninchen	Novus Biologicals	1:1000 (ICH)
anti-CD11b-PE/Cy7	Ratte	BioLegend®	1:400 (DZ)
anti-CD11c-APC	Hamster	BioLegend®	1:400 (DZ)
anti-CD31	Ratte	Dianova	1:100 (ICH)
anti-CD31-PE	Ratte	BioLegend®	1:200 (DZ)
anti-CD34-PE	Ratte	BioLegend®	1:200 (DZ)
anti-CD3-Pacific-Blue	Ratte	BioLegend®	1:800 (DZ)

anti-CD43-APC	Ratte	BioLegend®	1:400 (DZ)
anti-CD49b-APC	Ratte	BioLegend®	1:800 (DZ)
anti-CD4-FITC	Ratte	BioLegend®	1:400 (DZ)
anti-CD62L-PE/Cy7	Ratte	BioLegend®	1:400 (DZ)
anti-CD86-Biotin	Ratte	BioLegend®	1:800 (DZ)
anti-CD8a-PE	Ratte	BioLegend®	1:800 (DZ)
anti-F4/80-FITC	Ratte	BioLegend®	1:400 (DZ)
anti-GLUT1	Kaninchen	Abcam	1:1000 (IHC)
anti-Ki-67	Kaninchen	DCS	1:200 (IHC)
anti-Ly-6G/Ly-6C (Gr1)-Pacific-Blue	Ratte	BioLegend®	1:400 (DZ)
anti-NK1.1-PE/Cy7	Maus	BioLegend®	1:800 (DZ)
anti-CD16/32 (Fc-Block)	Maus	Biolegend	1:200 (DZ)
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Streptavidin-Pacific Blue		Molecular Probes	1:1000
Streptavidin-FITC		BioLegend®	1:800
anti-Kaninchen (biotinyliert)	Ziege IgG	Santa Cruz	1:200
anti-Ratte (biotinyliert)	Ziege IgG	Santa Cruz	1:200
Fixable Viability Dye eFluor® 780 (FVD)		eBioscience	1:200 (DZ)

### 3.1.5 cDNA-Synthese, PCR und quantitative Realtime-PCR

Tabelle 3.6: Reagenzien und Enzyme für die cDNA-Synthese, PCR und Real-Time PCR.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
5x Go Taq® Buffer	Invitrogen
GoTaq® DNA Polymerase	Invitrogen
MESA Green qPCR MastermixPlus for SYBR® ASSAY	Eurogentec
M-MLV RT 5x Reaction Buffer	Promega
M-MMLV Reverse Transkriptase	Promega
NTPs	Qiagen
Oligo dt	Invitrogen
Terra™ PCR Direct Polymerase Mix	Clontech



### 3.1.6 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Life Technologies GmbH bezogen und sind ausschließlich für die Identifikation von Genen mit cDNA muriner Herkunft geeignet.

**Tabelle 3.7: Verwendete murine Primer.** Sequenzen, Fragmentlänge, Annealing-Temperatur und Zyklenzahl.

Gen	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge (bp)	PCR
16S <i>forward</i>	AGA TGA TCG AGC CGC GC	163	60°C
16S <i>reverse</i>	GCT ACC AGG GCC TTT GAG ATG GA		25cyc
ADAM10 <i>forward</i>	CTC TTT GCA GTG GAG CAA GC	204	60°C
ADAM10 <i>reverse</i>	CAC CAG TGA GCC ACA ATC CA		30cyc
Bcl2 <i>forward</i>	GGA GGC TGG GAT GCC TTT GT	142	61°C
Bcl2 <i>reverse</i>	ACT TGT GGC CCA GGT ATG C		30cyc
Brca1 <i>forward</i>	GAC GAG TCA GGG ATG GGA AG	209	60°C
Brca1 <i>reverse</i>	GGG GTT CCT TCT AGC TCT CG		35cyc
CAIX <i>forward</i>	GTG GAT GTT CTG CCC AGT GA	182	58°C
CAIX <i>reverse</i>	TGG CCA CCC CCT TTT TCA TC		35cyc
COX2 <i>forward</i>	CAG GTC ATT GGT GGA GAG GT	180	60°C
COX2 <i>reverse</i>	GTC GCA CAC TCT GTT GTG CT		30cyc
Cre <i>forward</i>	TGC AAG TTG AAT AAC CGG AAA	wt: -	57°C
Cre <i>reverse</i>	CTA GAG CCT GTT TTG CAC GTT C	Cre: 241	34cyc
HIF-1 DF <i>forward</i>	GGA GCT ATC TCT CTA GAC C	wt: 200	57°C
HIF-1 DF <i>reverse</i>	GCA GTT AAG AGC ACT AGT TG	DF: 250	34cyc
FOXP3 <i>forward</i>	CTG GCG AAG GGC TCG GTA GTC CT	250	60°C
FOXP3 <i>reverse</i>	CTC CCA GAG CCC ATG GCA GAA GT		30cyc
GLUT1 <i>forward</i>	GAG GAG CTC TTC CAC CCT CT	191	60°C
GLUT1 <i>reverse</i>	TCC TCC TGG ACT TCA CTG CT		28cyc
HIF-1α <i>forward</i>	GAA ATG GCC CAG TGA GAA AA	119	60°C
HIF-1α <i>reverse</i>	CTT CCA CGT TGC TGA CTT GA		28cyc
HIF-1α Exon2 <i>forward</i>	CAT CCA GAA GTT TTC TCA CAC G	138	60°C
HIF-1α Exon2 <i>reverse</i>	GGC GAA GCA AAG AGT CTG AA		30cyc

HIF-2 $\alpha$ <i>forward</i>	AGG AGA CGG AGG TCT TCT ATG A	126	60°C
HIF-2 $\alpha$ <i>reverse</i>	ACA GGA GCT TAT GTG TCC GA		28cyc
MMP2 <i>forward</i>	ACA CTG GGA CCT GTC ACT CC	117	60°C
MMP2 <i>reverse</i>	TGT CAC TGT CCG CCA AAT AA		30cyc
MMP9 <i>forward</i>	TGA ATC AGC TGG CTT TTG TG	191	60°C
MMP9 <i>reverse</i>	ACC TTC CAG TAG GGG CAA CT		30cyc
PGK1 <i>forward</i>	AGC CTT TGC CAG GGG AAC CA	250	60°C
PGK1 <i>reverse</i>	GGA GCA CAG GAA CCA AAG GCA GG		25cyc
PHD2 <i>forward</i>	AGC CAT GGT TGC TTG TTA CC	186	58°C
PHD2 <i>reverse</i>	TTG GGT TCA ATG TCA GCA AA		30cyc
PHD3 <i>forward</i>	GGC TGG ACT TCA TGT GGA TT	211	60°C
PHD3 <i>reverse</i>	CAG GTT ATG TTC GCC ATG TG		30cyc
PyMT <i>forward</i>	GGA AGC AAG TAC TTC ACA AGG G	wt: -	60°C
PyMT <i>reverse</i>	GGA AAG TCA CTA GGA GCA GGG	PyMT: 556	35cyc
Trp53 <i>forward</i>	AAT GTC TCC TGG CTC AGA GG	127	60°C
Trp53 <i>reverse</i>	CTA GCA TTC AGG CCC TCA TC		30cyc
VEGF <i>forward</i>	AAT GCT TTC TCC GCT CTG AA	143	60°C
VEGF <i>reverse</i>	GAT CAT GCG GAT CAA ACC TC		35cyc

### 3.1.7 Kommerzielle Kits

**Tabelle 3.8: Auflistung verwendeter kommerzieller Kits.**

Bezeichnung	Hersteller
DAB Substrate Kit	Zytomed Systems
ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
Nitric Oxide (NO <sub>2</sub> / NO <sub>3</sub> ) detection Kit	Enzo Life Sciences
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories
Vector Mouse on Mouse (M.O.M.™) Kit	Vector Laboratories
DAB Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories
ZytoChem plus HRP Polymer anti-Rabbit	Zytomed Systems

## 3.2 Tierexperimentelle Methoden

### 3.2.1 Tierhaltung und –zucht

Alle Mäuse wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen unter kontrollierten Umweltbedingungen und einem konstanten 12 h-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Bis zu fünf weibliche oder männliche Mäuse saßen in einem Makrolon®-Filterkäfig Typ III und erhielten pelletiertes Alleinfuttermittel und Trinkwasser *ad libitum*.

Die Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Vorschriften zur Haltung und Verwendung von Labortieren des Universitätsklinikums Essen und sind konform mit dem Tierschutz nach Art. 20a GG. Die Genehmigung des Tierversuchs und der Organentnahme erfolgte unter der Ordnungsnummer AZ 8.87-50.10.37.09.205 G 1067/09 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen.

### 3.2.2 Transgene Mausstämme

In der vorliegenden Studie wurde ein transgenes Mausmodell verwendet. Das Modell wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Systems und drei unterschiedlichen Stämmen generiert. Von Herrn Prof. Dr. Randall Johnson (University of Cambridge, UK) wurden freundlicherweise Mäuse, die transgen das Polyoma-Middle T (PyMT) Onkoprotein unter dem Einfluss des Maus-Mammatumovirus (MMTV)-*long terminal repeat* (LTR) Promotors exprimieren, zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse entwickeln spontan autochthone Mammatumore. Die MMTV-PyMT-Mäuse wurden zunächst mit Mäusen, bei denen das Exon 2 des HIF-1 $\alpha$ -Gens beidseitig von loxP-Sequenzen flankiert (HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ , C57BL/6J) ist, gekreuzt. Für den spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Knockout in Tumorzellen des Brustepithels (*Mammary epithelial tumor cell* = MEC) wurden HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -MMTV-PyMT-Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die transgen die P1 Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des MMTV-LTR-Promoters (MMTV-Cre, FVB/B6129F1) exprimieren. Die Cre-Rekombinase erfasst die loxP-Sequenzen und schneidet das Exon 2 des HIF-1 $\alpha$ -Gens heraus; somit kommt es zum Verlust der DNA-Bindungsdomäne und es wird kein funktionelles HIF-1 $\alpha$ -Protein aus der resultierenden mRNA gebildet. Die HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -

sowie die MMTV-Cre-Mäuse wurden kommerziell von *The Jackson Laboratory*, USA erworben.

Für die Versuche wurden weibliche Mäuse mindestens für 8 Generationen auf C57BL/6J zurückgekreuzt, und folgende Tiere mit einer Deletion von HIF-1 $\alpha$  im Brustepithel (**HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup>**: HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup>, MMTV-PyMT positiv, MMTV-Cre positiv) sowie deren weibliche Geschwister ohne Cre-Rekombinase-Aktivität als Kontrolltiere (**HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup>**: HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup>, MMTV-PyMT positiv, MMTV-Cre negativ) verwendet.

### 3.2.3 Genotypisierung

Im Alter von etwa vier Wochen wurden die Mäuse abgesetzt und durch Ausstanzungen eines oder mehrerer Ohrlöcher markiert. Das entnommene Ohrgewebe wurde in 300  $\mu$ l 50 mM NaOH bei 100 °C für 1-2 h erhitzt. Anschließend wurden 30  $\mu$ l 1 M Tris-HCl hinzugefügt, durchmischt und Gewebereste abzentrifugiert. Es wurden 2,5  $\mu$ l genomische DNA und 22,5  $\mu$ l Mastermix (Tabelle 3.9) für die PCR eingesetzt. Die PCR mit den HIF-1 DF- sowie den myeloid zellspezifischen Cre-Primern wurde, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, durchgeführt. Die Genotypisierung mit den PyMT-Primern erfolgte mit dem Terra™ PCR Direct Polymerase Mix (Clontech) und einem alternativen PCR-Programm: Die Proben wurden für 2 min bei 98°C denaturiert, anschließend folgte in 35 Zyklen die Denaturierung bei 98°C für 10 s, das Annealing bei 60°C für 15 s und die Elongation bei 68°C für 34 s.

**Tabelle 3.9: Ansatz für die Genotypisierungs-PCR.** Links: Mastermix für die HIF-1 DF- und Cre-Genotypisierung. Rechts: Mastermix für die PyMT-Genotypisierung.

Volumen [ $\mu$ l]		Volumen [ $\mu$ l]	
5x PCR-Puffer	5	Puffer	12,5
NTPs	2		
Primer	je 0,5	Primer	je 0,38
H <sub>2</sub> O	14,5	H <sub>2</sub> O	8,75
Taq-Polymerase	0,05	Taq-Polymerase	0,5

### 3.2.4 Experimenteller Verlauf der Versuchsreihe

Die Brustdrüsen der HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup>- und HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup>-Mäuse wurden ab dem 80. Lebenstag dreimal wöchentlich durch Palpation auf Tumorwachstum hin untersucht. Sobald ein Tumor tastbar war, wurde mit der Behandlung begonnen. Eine Gruppe erhielt alle drei Tage eine intraperitoneale Injektion des NO-Donors DETA-NO (80 mg/kg KG) in 100  $\mu$ l NaCl, die Kontrollgruppe 100  $\mu$ l NaCl. Nach vier Wochen (10 Injektionen) wurden die Mäuse 4 h nach der letzten Injektion mit Isofluran betäubt und mit nicht-heparinisierten Kapillaren Blut aus den inneren Augenwinkeln entnommen. Sofort nach der Entnahme wurde das Blut bei 10.000 rpm 10 min zentrifugiert und das Serum bis zur Messung des Nitrat/Nitrit-Gehalts bei -20°C aufbewahrt. Nach anschließender zervikaler Dislokation wurden die Lunge, die mediastinalen und axillären Lymphknoten, die Milz sowie bis zu zehn Brusttumore entfernt. Tumore, ein Lungenflügel sowie Lymphknoten wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bis zur RNA-Isolierung und Proteinanalyse bei -80 °C eingefroren. Der andere Lungenflügel, Tumore und Lymphknoten wurden über Nacht in 4 % PFA aufbewahrt, anschließend in 70 % EtOH gelagert und in einem Gewebeeinbettautomat entwässert und in der Ausgießstation in Paraffin eingebettet. Im Anschluss daran wurden von den Lungen 10  $\mu$ m-Serienschnitte und von den Tumoren 1  $\mu$ m Schnitte angefertigt.

Zwei Tumore, Milz und Lymphknoten wurden für die Durchflusszytometrie mechanisch zerkleinert und in Lysepuffer 1 h bei 37 C inkubiert (Kapitel 3.3.5).

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode nach Chomczynski & Sacchi, (1987). Zunächst wurde das gefrorene Tumorgewebe in GTC (4 M, 10 ml pro g Gewebe) homogenisiert und 15 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. 700  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 70  $\mu$ l NaOAc (2 M, pH = 4) angesäuert, anschließend wurden die Proben mit 500  $\mu$ l Phenol sowie 350  $\mu$ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:25:1) versetzt und durchmischt. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden die Proben 30 min bei

13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach mind. 4 h bei -20 °C wurde erneut 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 300 µl GTC (4 M) und 500 µl Isopropanol aufgenommen und mind. 1 h bei -20 °C weggefroren. Nach weiterer Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Zellellet mit 75 % EtOH gewaschen, in DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und 10 min bei 60 °C inkubiert.

Abschließend wurde der RNA-Gehalt mit einem Photometer (Epoch) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Reinheit durch Bildung des Quotienten bei 260/280 ermittelt, es wurden nur Proben mit einem Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 verwendet. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.3.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA mit 2,5 µl Oligo-dT Primer und DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 12 µl gebracht. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 68 °C inkubiert und auf Eis 5 min gekühlt. Es folgte die Zugabe von 13 µl RT-Mastermix (Tabelle 3.10) und die Umschreibung der RNA im Thermocycler 90 min bei 45 °C, 30 min bei 52 °C und 15 min bei 95 °C. Die cDNA wurde bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 3.10: Ansatz für den RT-Mastermix zur cDNA-Synthese.**

	Volumen [µl]
RT-Puffer (5x)	5
NTPs	5
Reverse Transkriptase	0,5
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,5

### 3.3.3 PCR

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde die Expression bestimmter Gene semiquantitativ bestimmt. Die PCR-Ansätze wurden, wie in Tabelle 3.11 aufgeführt, zusammengestellt. Anschließend wurde die PCR, wie in Tabelle 3.12 beispielhaft gezeigt, in den Thermocyclern Mastercycler (Eppendorf), Thermocycler Tpersonal/Tprofessional (Biometra) durchgeführt. Die Annealing-Temperatur sowie die Zyklenzahl wurden den verwendeten Primern (Tabelle 3.7) angepasst. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels einer horizontalen Gelelektrophorese. Hierzu wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele (in TAE-Puffer) mit 0,01 % Ethidiumbromid-Lösung verwendet und die Proben sowie ein Größenstandard bei 100 V mind. 45 min aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels UV-Licht in einer Geldokumentationsanlage.

**Tabelle 3.11: Ansatz für den PCR-Mastermix.**

	Volumen [ $\mu$ l]
DNA-Template	0,5
PCR-Puffer (5x)	5
NTPs	2
Primer <i>forward</i> (20 pmol/ $\mu$ l)	0,5
Primer <i>reverse</i> (20 pmol/ $\mu$ l)	0,5
Taq-Polymerase	0,05
H <sub>2</sub> O	17

**Tabelle 3.12: Exemplarisches PCR-Programm.** Die Annealing-Temperatur und die Zyklenzahl wurden den jeweiligen Primern angepasst.

	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Zyklen
Initialphase	96	3	1
Denaturierung	96	1	
Annealing	60	1,5	x 30
Elongation	72	3	
abschließende Synthese	72	10	1

### 3.3.4 Quantitative Realtime-PCR

Der quantitative Nachweis der Genexpression erfolgte in einer Doppelbestimmung (2 x 20 µl) je Probe. Die Reaktionsansätze wurden nach Tabelle 3.13 erstellt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Zwei-Schritt-Programm mit gleichzeitiger Fluoreszenz-Messung in einem Real-Time System Thermal Cycler (Bio-Rad) (Tabelle 3.14). Im Anschluss daran wurde eine Schmelzkurve erstellt, indem die Proben von 65 °C in 0,5 °C-Schritten auf 95 °C erhitzt und die Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Bei einem reinen Amplifikat wurde für den entsprechenden Schmelzpunkt ein einheitliches Maximum detektiert.

**Tabelle 3.13: Ansatz für die Doppelbestimmung der Genexpression mittels quantitativer Realtime-PCR.**

	Volumen [µl]
cDNA	1
MESA Green qPCR MastermixPlus	25
Primer <i>forward</i> (20 pmol/µl)	1
Primer <i>reverse</i> (20 pmol/µl)	1
H <sub>2</sub> O	22

**Tabelle 3.14: Beispiel eines Realtime-PCR-Programms zur Quantifizierung der Genexpression.** Die Annealing-Temperatur und die Zyklenzahl wurden den jeweiligen Primern angepasst.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initialphase	95	10	1
Denaturierung	95	0,25	
Annealing / Elongation	60	1	x 30



Die Auswertung erfolgte mit dem Bio-Rad CFX Manager 3.1 Programm und mittels der relativen Quantifizierung, der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (*Cycle Threshold*). Die zu untersuchenden Zielgene wurden auf das nicht regulierte und gleichmäßig exprimierte Referenzgen ribosomales Protein (ribP) bezogen.

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}(\text{Zielgen}) - \text{CT}(\text{ribP})$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \text{CT}(\text{Behandlung}) - \text{CT}(\text{Kontrolle})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

### 3.3.5 Durchflusszytometrie

Milz und Lymphknoten wurden zur Vorbereitung für die Durchflusszytometrie durch ein 70  $\mu\text{m}$ -Zellsieb gerieben und mit 10 ml 1x PBS gespült, mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und anschließend 5 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert und auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Das entnommene Tumorgewebe wurde mechanisch zerkleinert und in 10 ml Lysepuffer bei 37 °C 1 h inkubiert. Danach wurde die Suspension durch ein 70  $\mu\text{m}$ -Zellsieb gerieben, 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml Lyse-Stopp-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde erneut durch ein 40  $\mu\text{m}$ -Zellsieb gerieben und 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml ACK-Puffer aufgenommen und 2 min inkubiert, bevor die Reaktion mit 7 ml 1x PBS gestoppt wurde. Anschließend wurde mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml Puffer eingestellt.

Die Färbung von Oberflächenproteinen erfolgte in einer 96-well-Rundbodenplatte. Zunächst wurden die Zellen mit Fc-Block (1:200) bei 4 °C 15 min inkubiert, es folgte die Zugabe der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 3.5) zusammen mit FVD für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen. Bei biotinylierten Antikörpern erfolgte die Zugabe mit einem an Streptavidin gekoppeltem Fluorochrom, welches 10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer und Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min wurden die Lymphknoten und

Tumorzellen in 110 µl, die Milzzellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messungen wurden im Durchflusszytometer CANTO II Flow Cytometer (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der FACS Diva Software.

### 3.3.6 Bestimmung der Nitrit- und Nitratkonzentration im Serum

Die Nitrit- und Nitratkonzentration im Serum wurde mit dem *Nitric Oxide (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) detection kit* (Enzo® Life Science) ermittelt. Alle Reagenzien und Lösungen wurden nach Herstellerangaben hergestellt und verwendet. Das Serum wurde zuvor mit dem mitgelieferten Reaktionspuffer 1:2 bis 1:20 verdünnt, um das für den Assay notwendige Probenvolumen von 100 µl zu erreichen. Im Anschluss daran folgte die Ultrazentrifugation durch eine 10 kDa Filtereinheit (Amicon® Ultra – 0,5 ml Centrifugal Filters Ultracel® - 10K, Millipore) bei 13200 rpm für 20 min. Das Filtrat wurde sofort für den Assay benutzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm im Photometer (Epoch).

## 3.4 Histologische Methoden

### 3.4.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H & E)

Sowohl die Lungen als auch die Tumore wurden Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dazu wurden die Paraffinschnitte zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe je 5 min rehydriert (Isopropanol, 90 %, 70 %, 50 % EtOH, kurz in VE-H<sub>2</sub>O). Anschließend wurden die Schnitte 1 min mit Hämatoxylin gefärbt, dieser natürliche Farbstoff färbt saure bzw. basophile Strukturen, wie z. B. Zellkerne und endoplasmatisches Retikulum. Durch das folgende Spülen mit Leitungswasser (sog. Bläuen) erfolgt ein pH-Wechsel und die charakteristische blaue Kernfärbung wird sichtbar. Nach kurzem Spülen mit VE-H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte 1 min mit Eosin gegengefärbt. Dieser synthetische Farbstoff färbt basische oder acidophile Zellstrukturen, wie z. B. Zytoplasma rot. Nach erneutem Waschen mit VE-H<sub>2</sub>O wurden die Paraffinschnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 % EtOH,

Isopropanol, Xylol) je 5 min dehydriert. Anschließend wurde ein Tropfen Entellan® auf den Gewebeschnitt gegeben und mit einem Glasplättchen zugedeckt. Nach dem Trocknen erfolgte die Begutachtung der Schnitte durch ein Durchlichtmikroskop Axiovert 200M (Zeiss).

### 3.4.2 Immunhistochemische Färbungen

Zunächst wurden die Gewebeschnitte in Xylol entparaffiniert (zweimal, je 5 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 5 min 100 %, 96 %, 90 %, 80 % und 70 % EtOH) und zuletzt in VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einem Schnellkochtopf 15 min in Citratpuffer, pH = 6; (Target Retrieval Solution, Dako) gekocht und bei Raumtemperatur 30 min abgekühlt, danach in TBS gewaschen (2 x 2 min). Um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken, wurden die Paraffinschnitte in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min inkubiert und erneut mit TBS gewaschen (2 x 2 min). Ab diesem Schritt folgen zwei immunhistochemische Färbemethoden (vgl. Tabelle 3.15).

#### Methode A (ABC-Kit)

Die Schnitte wurden zur Unterdrückung von unspezifischen Bindungen der Antikörper mit dem Gewebe bei Raumtemperatur 1 h in 5 % NGS (*Normal Goat Serum*) in TBS inkubiert. Es folgte die Inkubation des primären Antikörpers in 5 % NGS bei 4 °C für 12 h, auf den Negativkontrollen verblieb das NGS. Nach dem Waschen in TBS (3 x 2 min) wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper (1:200 in 5 % NGS) aufgetragen; nach 30 min bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte erneut in TBS gewaschen (2 x 2 min). Der Avidin/Biotin-Komplex wurde nach Herstellerangaben (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) angesetzt und für 30 min auf den Schnitten belassen. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) in TBS folgte die Inkubation (2-10 min) mit einer Chromogen-Lösung aus 3,3-Diaminobenzidin (DAB) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welche ebenfalls nach Herstellerangaben (DAB Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories) zusammengestellt wurde. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (ca. 20 s) und das Bläuen mit VE-H<sub>2</sub>O. Im Anschluss daran wurden die Gewebeschnitte wieder in der aufsteigenden Alkoholreihe rehydriert (70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 100 % EtOH, Xylol) und mit Entellan® eingedeckt.

### **Methode B (Zytomed-Kit)**

Zunächst wurde auch hier die Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindungen der Antikörper durch eine fünfminütige Inkubation mit der Blockierungslösung aus dem kommerziellen ZytoChem plus HRP Polymer anti-Rabbit Kit, (Zytomed System) minimiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in Antibody Diluent (Zytomed) verdünnt auf die Paraffinschnitte gegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde mit TBS (3 x 2 min) gewaschen und das HRP (Horseradish Peroxidase)-Polymer anti-rabbit (Zytomed) auf die Schnitte gegeben und dort für 30 min bei Raumtemperatur belassen und nach dem Waschen mit TBS (3 x 2 min) die Substrat/Chromogenlösung (DAB Substrate Kit, Zytomed) aufgetragen. Nach fünf Minuten wurde die Reaktion mit VE-H<sub>2</sub>O abgestoppt, und im Anschluss folgten die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die Dehydrierung mittels der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 100 % EtOH, Xylol). Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit Entellan® eingedeckt.

**Tabelle 3.15: Immunhistochemische Färbungen: Antikörper und Methoden.**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Methode</b>
anti-Ki-67	1:200	anti-Kaninchen (biotinyliert)	1:200	Methode A (ABC-Kit)
anti-CD31	1:100	anti-Ratte (biotinyliert)	1:200	Methode A (ABC-Kit)
anti-Glut1	1:1000	HRP-Polymer	-	Methode B (Zytomed-Kit)
anti-CAIX	1:1000	HRP-Polymer	-	Methode B (Zytomed-Kit)

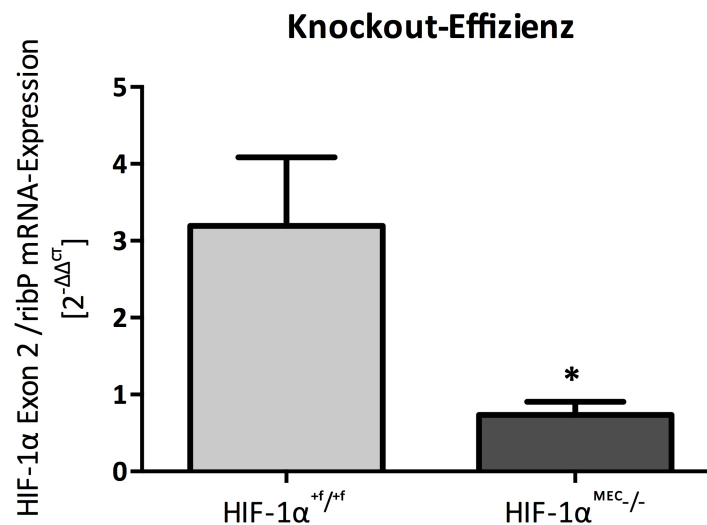
### **3.5 Statistische Auswertung**

Die Erhebung der immunhistochemischen Daten erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.46r oder dem ImmunoRatio-Programm (Tuominen et al. 2010) sowie Microsoft Excel 2010. Es wurden pro Maus und Tumor je fünf Bilder ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism® Version 5.04 mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse und als Post-hoc-Test der Newman-Keuls Multiple Comparison Test. Ergebnisse mit einem p-Wert ab  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Knockout-Effizienz in Tumoren der HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup>-Mäusen

Um die Effizienz des Knockouts von HIF-1 $\alpha$  im Brustepithel in HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup>-Mäusen zu bestimmen, wurde die Expression des Exon 2 von HIF-1 $\alpha$  in den Tumoren aller Versuchstiere mittels Realtime-PCR ermittelt. Die mRNA-Expression des HIF-1 $\alpha$  Exon 2 in den Tumoren der HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup>-Mäusen war, im Gegensatz zu den HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup>-Mäusen, zwar nicht vollständig, aber signifikant um mehr als 75 % reduziert (s. Abbildung 4.1.).



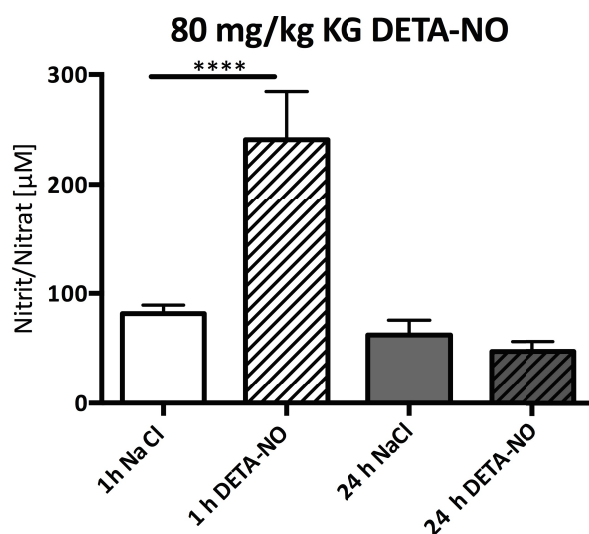
**Abbildung 4.1: Signifikante Knockout-Effizienz in Tumoren von HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup>- und HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup>-Mäusen.**

Die Ermittlung der Knockout-Effizienz erfolgte aus den Tumorzellen mittels Realtime-PCR. Die Expression des HIF-1 $\alpha$  Exon 2 ist in den HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup>-Mäusen (n = 11) im Vergleich zu den HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup>-Mäusen (n = 10) um mehr als 75 % reduziert, Mittelwerte  $\pm$  SEM, P = 0,0106.

#### 4.1.1 Steigerung des Nitrit/Nitrat-Levels nach Injektion von 80mg/kg KG DETA-NO im Serum

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die Mäuse eine Dosis von 80 mg/kg KG DETA-NO vertragen, und ob das freigesetzte NO im Serum der Mäuse zu detektieren ist. Dazu wurde Mäusen 1 h bzw. 24 h nach der intraperitonealen Injektion mit DETA-NO oder NaCl als Kontrolle Blut abgenommen und das erhaltene Serum mittels Griess-Assay auf den Nitrit/Nitrat ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ )-Gehalt hin untersucht.

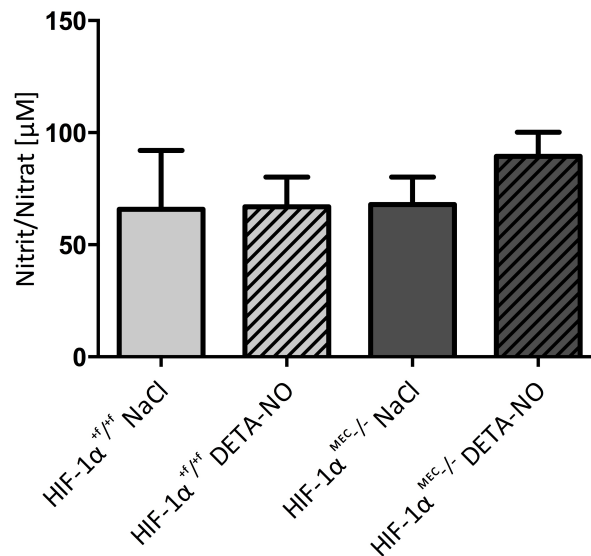
Alle Mäuse zeigten sowohl während und als auch nach der Injektion keine Auffälligkeiten. Nach einer Stunde wurde ein mehr als doppelt so hoher Gehalt an  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  in den Seren der mit DETA-NO behandelten Mäuse ermittelt. Nach 24 h Stunden war der  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ -Gehalt in beiden Gruppen auf die Basalwerte gesunken.



**Abbildung 4.2:** Bestimmung der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Serum mittels Griess-Assay. Nitrit/Nitrat-Konzentration im Serum 1, und 24 h nach Injektion von 80 mg/kg KG DETA-NO (1 h NaCl/DETA-NO jeweils n = 4, 24 h NaCl n = 8, 24 h DETA-NO n = 10), \*\*\*\*P<0,0001, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 4.1.2 Nitrit und Nitratspiegel im Serum nach 4 h

Die in Abbildung 4.3 verwendeten Serumproben wurden jeweils 4 h nach der letzten Injektion (10 Injektionen alle drei Tage) mit NaCl oder DETA-NO gewonnen und mithilfe des Griess-Assays die Konzentration von  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  bestimmt. Die mit DETA-NO-behandelten  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäuse wiesen eine leicht erhöhte  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ -Konzentration im Serum auf, während alle anderen Serumproben in etwa gleiche Konzentrationen aufzeigten.



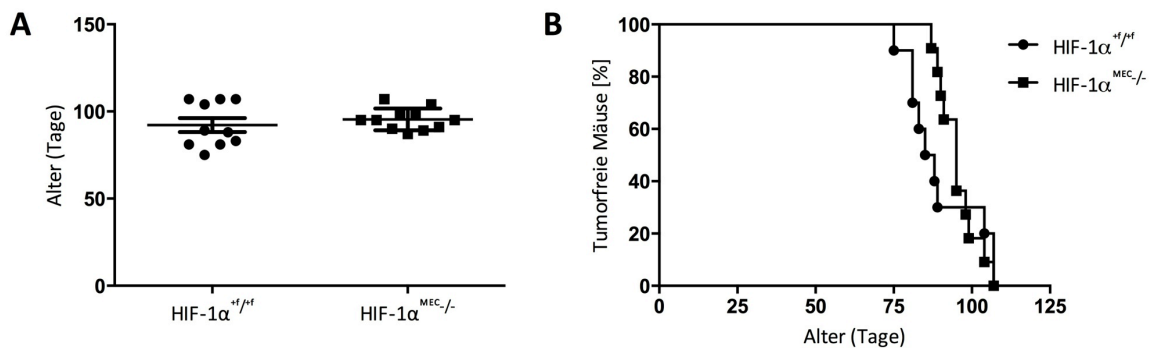
**Abbildung 4.3: Bestimmung der Nitrit/Nitrat-Konzentrationen im Serum 4 h nach letzter Injektion von 80 mg/kg KG DETA-NO.**  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 2,  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$  NaCl: n = 3,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$  DETA-NO n = 4, Mittelwerte  $\pm$  SEM.



## 4.2 Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -KO auf den Beginn des Tumorwachstums und Tumorgewicht

### 4.2.1 Deletion von HIF-1 $\alpha$ in Brustepithelzellen beeinflusst nicht den Beginn des Tumorwachstums

Die Brustdrüsen der Mäuse wurden ab dem 80. Lebenstag dreimal wöchentlich palpiert um den Beginn des Tumorwachstums zu dokumentieren. Die HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse entwickelten im Durchschnitt nach 92 Tagen, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse nach 95 Tagen den ersten tastbaren Tumor (s. Abbildung 4.4). Der epitheliale HIF-1 $\alpha$ -KO in Tumorzellen führt zu keinem beschleunigten oder verlangsamten Beginn des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe.

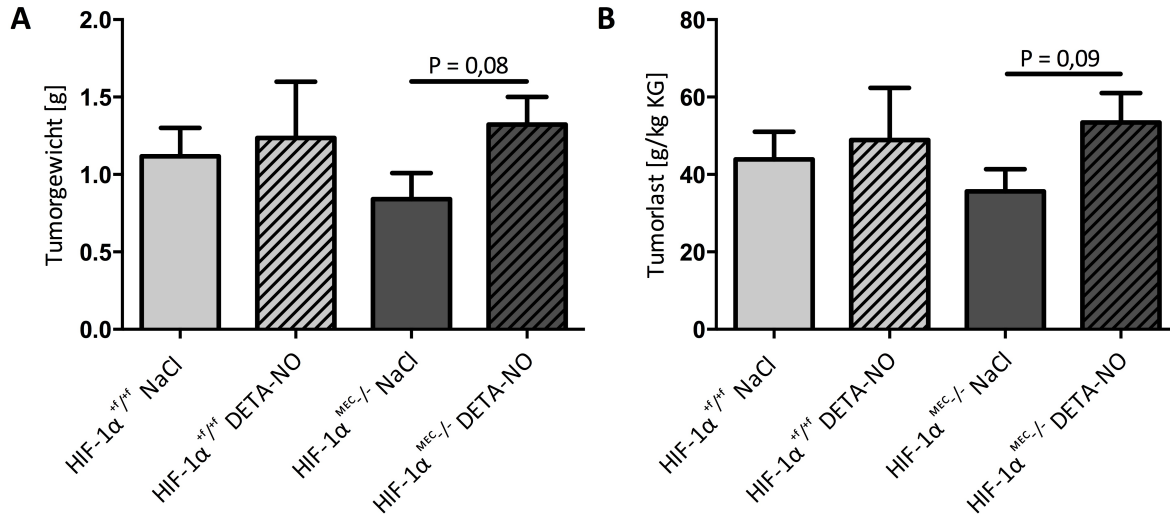


**Abbildung 4.4: Deletion des HIF-1 $\alpha$  in Brustepithelzellen hat keinen Einfluss auf den Beginn des Tumorwachstums.** A: Mittleres Alter bei Tumorwachstumsbeginn: HIF-1 $\alpha^{+/+}$  = 92 Tage (n = 10), HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  = 95 Tage (n = 11), Mittelwerte  $\pm$  SEM. B: Kaplan-Meier-Analyse des tumorfreien Intervalls: HIF-1 $\alpha^{+/+}$  = 87 Tage (n = 10), HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  = 95 Tage (n = 11).

### 4.2.2 Einfluss von HIF-1 $\alpha$ und NO auf das Tumorwachstum

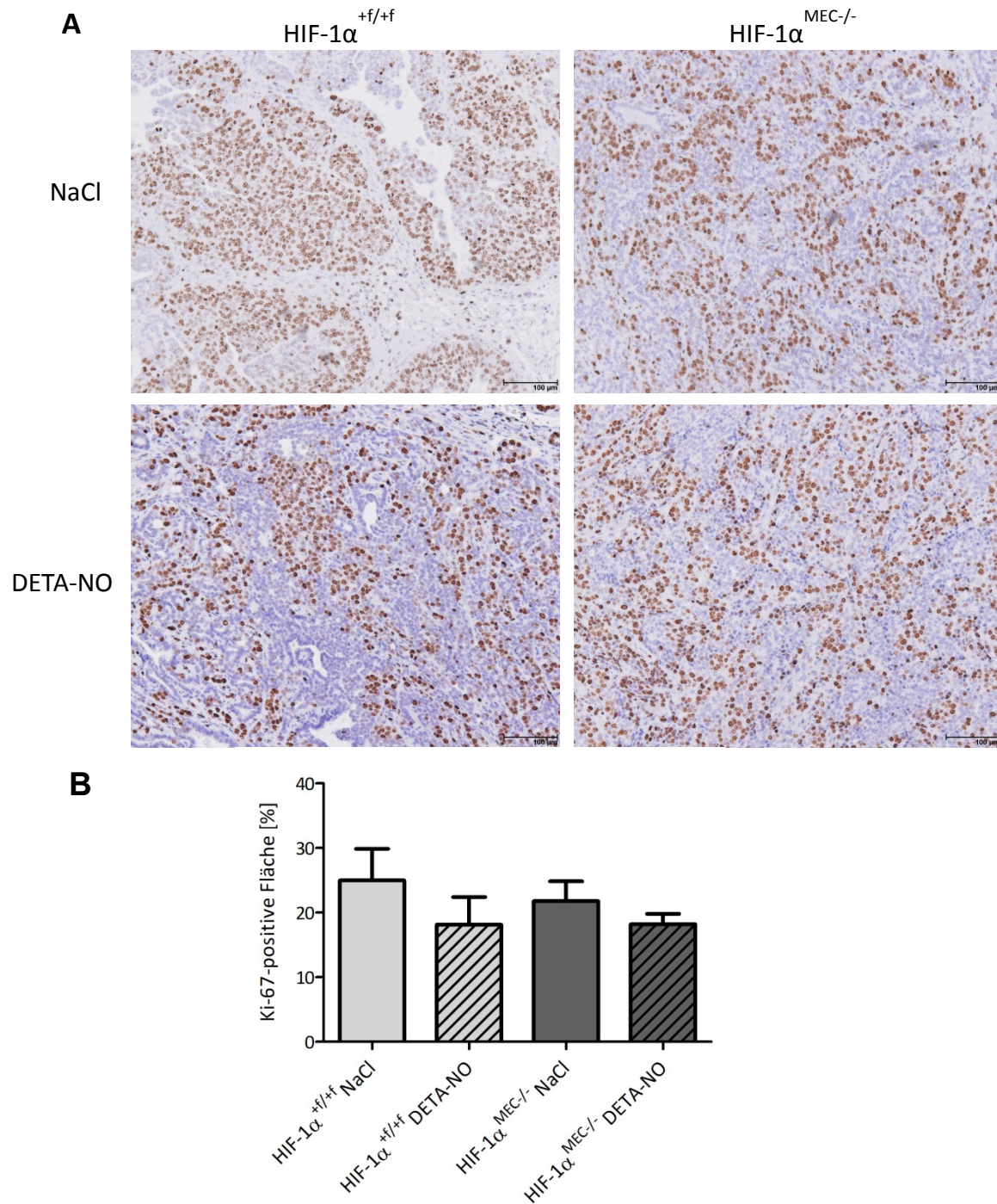
Die intraperitonealen Injektionen mit DETA-NO (80 mg/kg KG) oder NaCl erfolgten nach der Palpation des ersten Tumors. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von vier Wochen alle drei Tage durchgeführt. Im Anschluss daran wurden nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation alle Tumore entnommen und gewogen. Das Gesamtgewicht aller Tumoren pro Maus ist in Abbildung 4.5 A und bezogen auf das Körpergewicht in Abbildung 4.5 B dargestellt. Der epitheliale HIF-1 $\alpha$ -KO führte in KO Tieren zu einem leicht niedrigeren

Tumorgewicht als in den  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Mäusen. Die mit DETA-NO behandelten Tiere wiesen jedoch in beiden Gruppen ein höheres Tumorgewicht auf.



**Abbildung 4.5: Behandlung mit 80 mg/kg KG DETA-NO resultiert in höherem Tumorgewicht.** A: Tumorgewicht [g] aller Tumore pro Maus. B: Tumorlast [g/kg KG] aller Tumore pro Maus bezogen auf das Mausgewicht. Der  $\text{HIF-1}\alpha$ -KO führt zu einem niedrigeren Tumorgewicht, während die Gabe von DETA-NO in beiden Gruppen eine Gewichtszunahme indiziert.  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$  NaCl: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Es wurde bereits gezeigt, dass Tumore mit höherem Tumorgewicht vermehrt nekrotische Areale aufweisen und somit die Anzahl an proliferierenden Zellen im Tumor sinkt (Schwab et al. 2012). Im Einklang zu den durch DETA-NO erhöhten Tumorgewichten, ergab die immunhistochemische Auswertung des Proliferationsmarkers Ki-67 in diesen Tumoren eine geringere Ki-67-positive Fläche [%] im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Ein Unterschied zwischen den  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ - und  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäusen konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 4.6).



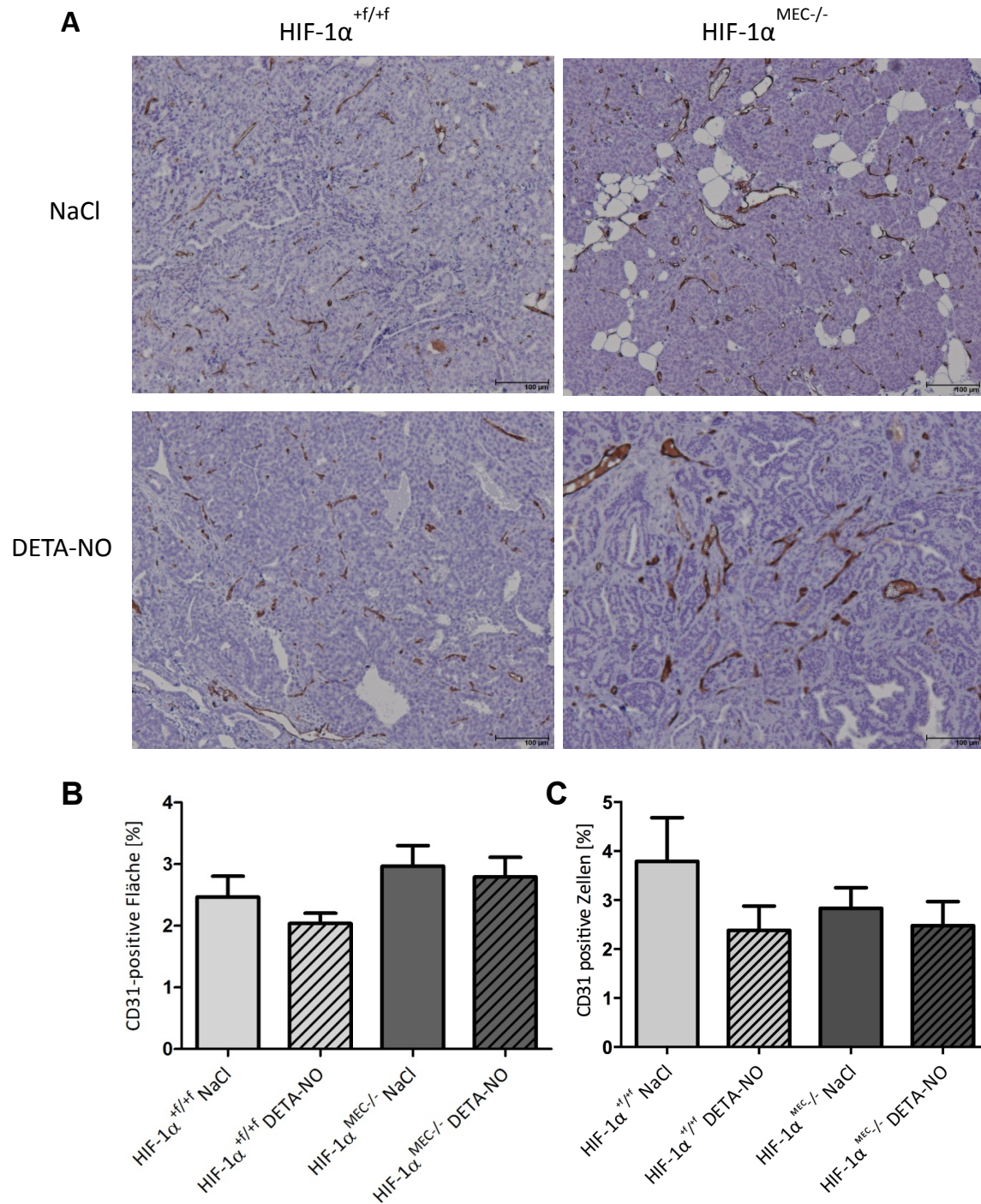
**Abbildung 4.6: DETA-NO behandelte Tumore proliferieren weniger.** A: Repräsentative immunhistochemische Färbung von Ki-67. B: Quantifizierung Ki-67-positiver Zellen. HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM. Maßstabsskala entspricht 100  $\mu$ m.

#### 4.2.3 Einfluss der HIF-1 $\alpha$ -Deletion auf die Blutgefäßentwicklung

Die Entstehung neuer Blutgefäße ist notwendig, um solide Tumore während ihres Wachstums mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Ryan et al. (2000) und Liao et al. (2007) zeigten bereits, dass kein signifikanter Unterschied in der Bildung neuer Blutgefäße in Tumoren von HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäusen besteht. Im Gegensatz dazu wird der Effekt von NO auf die Angiogenese in der Literatur kontrovers beschrieben. So werden in Abhängigkeit von Konzentration und Expositionsdauer pro- und antiangiogenetische Effekte beschrieben (Burke et al. 2013; Fukumura et al. 2006).

Die immunhistochemische Färbung von CD31 sollte Aufschluss darüber geben, ob aus der Behandlung mit DETA-NO in diesem autochthonen Tumormodell pro- oder antiangiogenetische Effekte resultieren. Die immunhistochemische Auswertung von CD31 ergab, dass im Gegensatz zu Ryan und Liao die Anzahl der Blutgefäße in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Tiere leicht höher ist als den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere. Die Behandlung mit DETA-NO führte tendenziell zu einer geringeren Ausbildung von Blutgefäße in Tumoren beider Genotypen (Abbildung 4.7 )





**Abbildung 4.7: Behandlung mit DETA-NO führte tendenziell zu einer geringeren Ausbildung von Blutgefäßen.** A: Repräsentative immunhistochemische Färbung von CD31. B: Quantifizierung CD31-positiver Blutgefäße. C: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD31 positiven Zellen. HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM. Maßstabsskala entspricht 100  $\mu$ m.

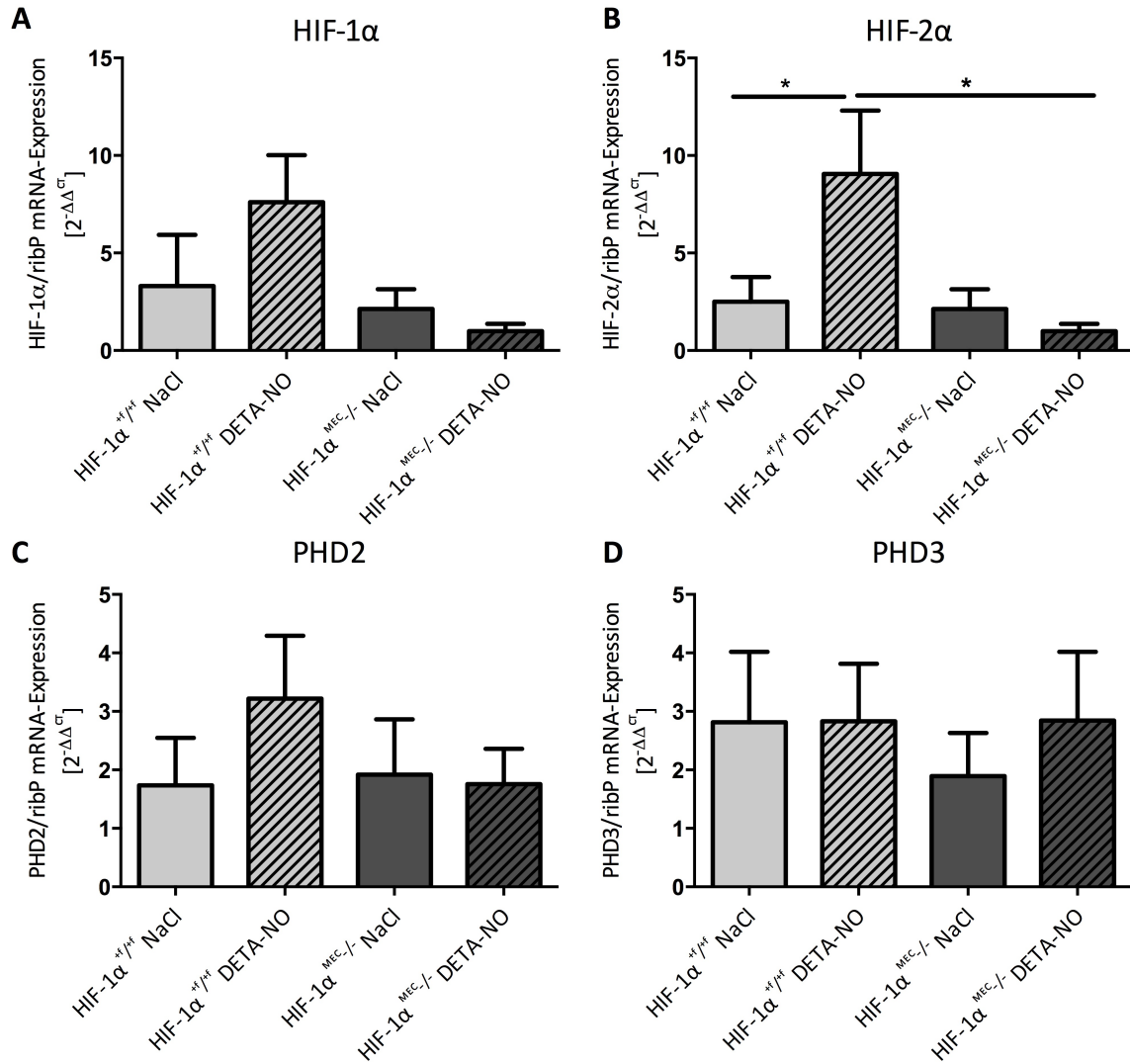
### 4.3 Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf die Zielgenexpression

HIF spielt nicht nur eine bedeutende Rolle in der Sauerstoffhomöostase, sondern reguliert eine Vielzahl an Genen, deren Produkte beteiligt sind z. B. an der pH-Regulation, dem Glukosemetabolismus oder der Angiogenese. Im folgenden Abschnitt wurden typische HIF-Zielgene, wie Carboanhydrase IX (CAIX), ein Enzym, welches den intra-und extrazellulären pH-Wert unter Hypoxie reguliert, Glucose-Transporter-1 (GLUT1) und Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1), zwei Enzyme des Glukosemetabolismus und der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), ein wichtiger Wachstumsfaktor der Angiogenese, auf ihre Protein bzw. mRNA-Expression hin untersucht (Hoskin, Sibtain, Daley, & Wilson, 2003; Lou et al., 2011; Semenza, 2012).

#### 4.3.1 Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -KO und DETA-NO auf die HIF- und PHD-mRNA-Expression

Zunächst wurden die mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und PHD2 und PHD3 in den Tumoren mittels Realtime-PCR ermittelt. Die Expression von HIF-1 $\alpha$  ist in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäuse höher als in den HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäusen. Durch die Behandlung mit DETA-NO stieg in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäuse, im Gegensatz zu den NaCl-behandelten Tieren, die Expression von HIF-1 $\alpha$  auf fast auf das Doppelte an. Dies entspricht dem in Kapitel 1.1.3 in Abbildung 1.3 beschriebenen regulatorischen Effekt von NO auf die HIF-1-Regulation. Für die länger andauernde Expositionsdauer von NO spricht, dass ebenfalls die Expression der PHD2 in diesen Tieren im Gegensatz zu den NaCl behandelten Tieren höher war (Abbildung 4.8 C). In den Tumoren HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäusen konnten unabhängig der Behandlung keine Unterschiede in der PHD2-Expression festgestellt werden.

Ähnlich verhielt es sich mit der Expression von HIF-2 $\alpha$ . In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäuse konnte eine signifikante Steigerung der HIF-2 $\alpha$ -mRNA Expression unter NO-Behandlung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde HIF-2 $\alpha$  in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäusen unter DETA-NO-Einfluss signifikant weniger exprimiert. In den beiden NaCl-Gruppen war die Expression von HIF-2 $\alpha$  gleich (Abbildung 4.8 C). Auch die Expression der PHD3 war in allen Gruppen, bis auf die tendenziell niedrigere Expression in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse (NaCl), gleich (Abbildung 4.8 D).



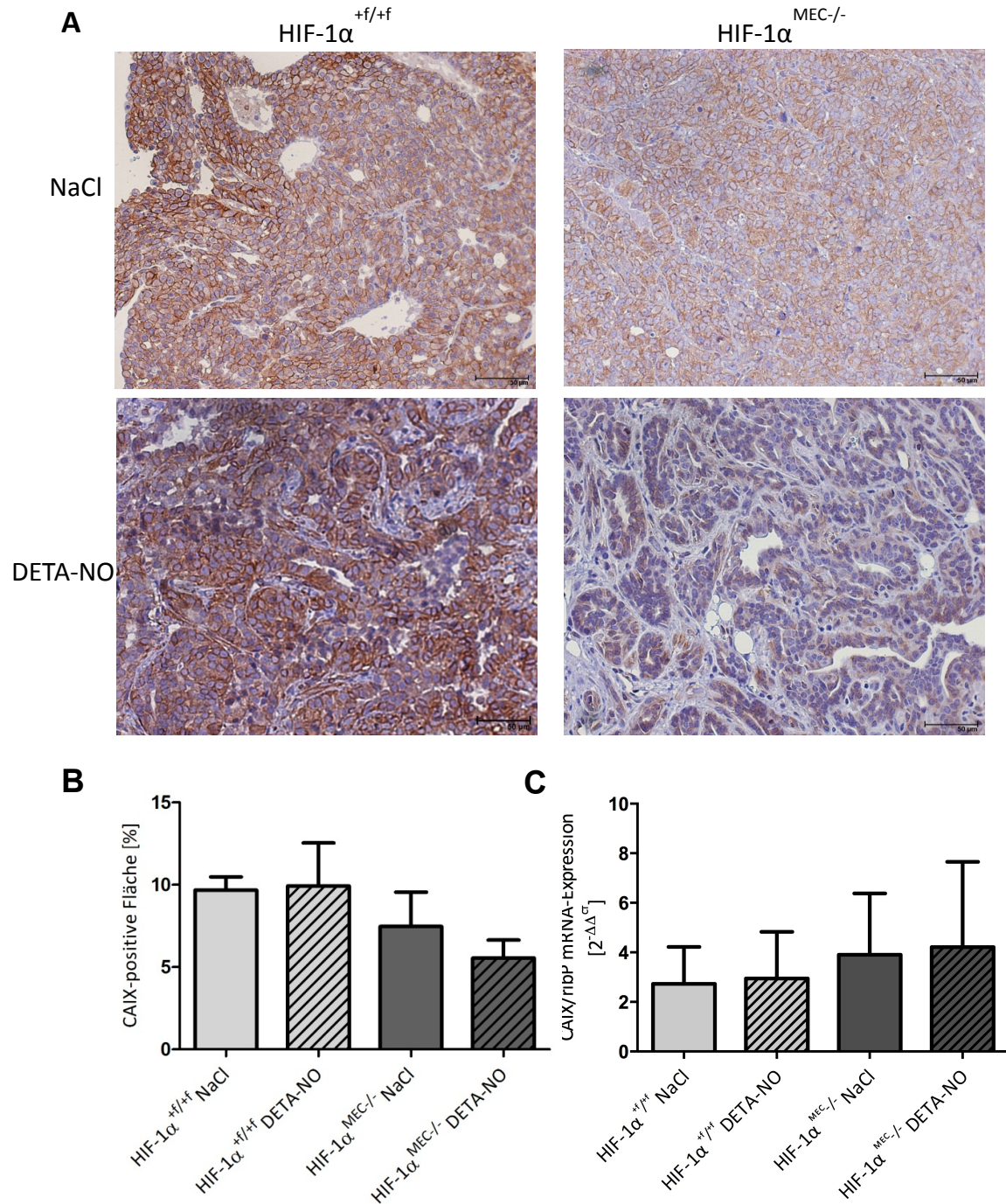
**Abbildung 4.8: Anstieg der HIF-1α- und PHD2-mRNA-Expression unter DETA-NO-Einfluss in Tumoren der HIF-1α<sup>+/+</sup>-Mäusen.** Analyse der Genexpression in Tumoren mittels Realtime-PCR. HIF-1α<sup>+/+</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>+/+</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte ± SEM. P ≤ 0,01.

#### **4.3.2 HIF-1 $\alpha$ -Knockout führt zu weniger Carboanhydrase IX in Tumoren**

Die Carboanhydrase IX (CAIX) ist ein transmembranäres Glykoprotein und ein HIF-1-Zielgen (Potter & Harris 2004). Die Hauptaufgabe von CAIX ist die pH-Wert-Regulation durch reversible Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid zu Kohlensäure. CAIX wird in vielen Krebsarten überexprimiert und steht eng im Zusammenhang mit der Beseitigung der Hypoxie-vermittelten Azidose in Tumoren (Thiry et al. 2006).

Die immunhistochemische Färbung von CAIX in Tumoren zeigt, dass die Tumore der HIF-1 $\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäuse tendenziell weniger CAIX aufwiesen als die Tumore der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere. Der Anteil an CAIX-positiver Fläche ist unter Einfluss von NO weiter reduziert worden. (Abbildung 4.9 A und B). Auf mRNA-Ebene konnte dies nicht bestätigt werden, hier scheint der Knockout und der Einfluss von NO genau umgekehrt zu sein, jedoch lassen die hohen Standardabweichungen keine genaue Aussage darüber zu (Abbildung 4.9 C).



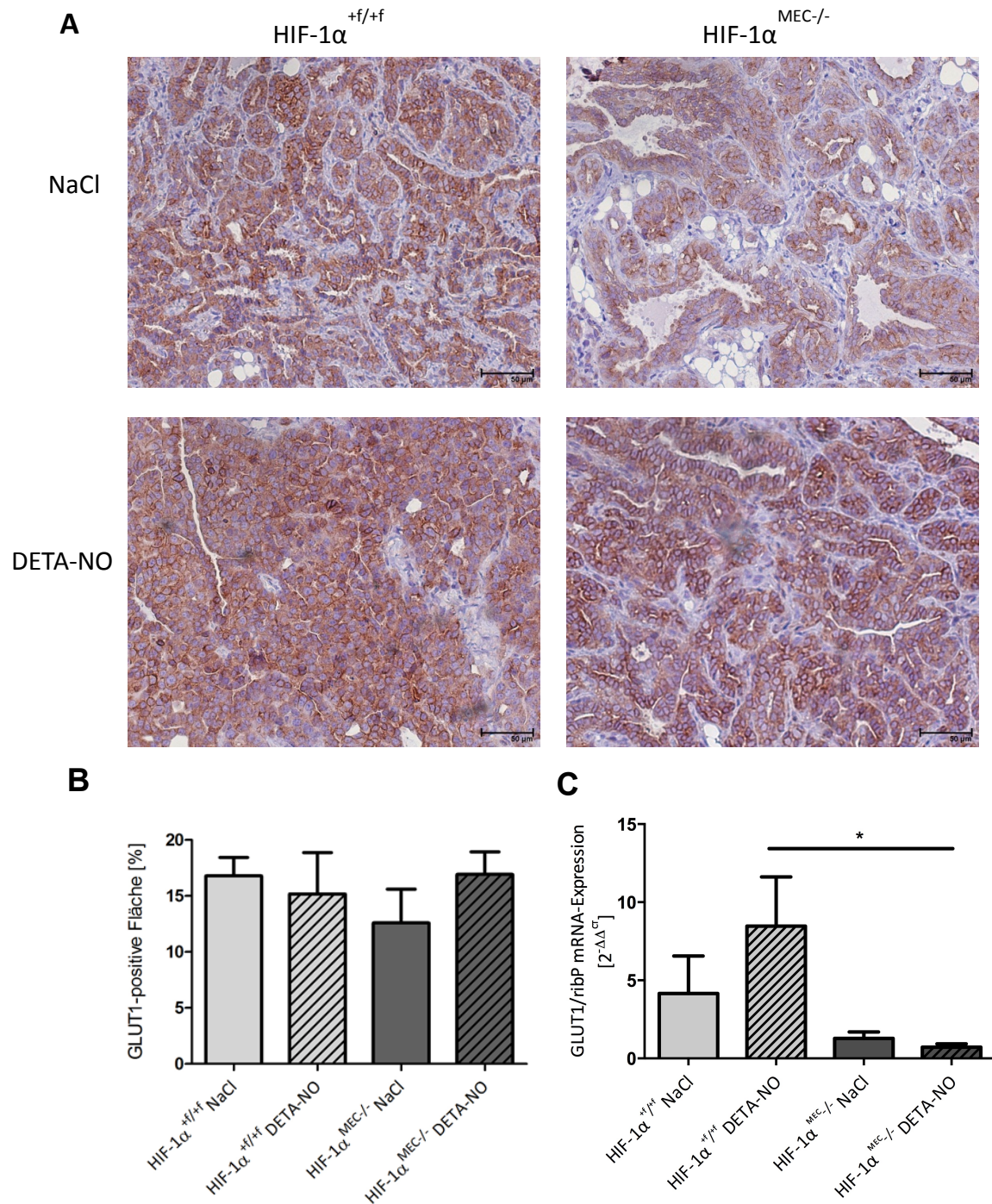


**Abbildung 4.9: Weniger CAIX-Protein HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC/-</sup>-Tumoren.** A: Repräsentative immunhistochemische Färbung von CAIX B: Quantifizierung CAIX-positiver Fläche. C: Quantitative Bestimmung von CAIX auf mRNA-Ebene mittels Realtime-PCR. HIF-1 $\alpha$ <sup>+/+</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>+/+</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM. Maßstabsskala entspricht 50  $\mu$ m.

#### **4.3.3 Unterschiedliche Auswirkungen des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts auf GLUT1 auf Proteinlevel und mRNA-Ebene**

Ein weiteres wichtiges HIF-1 $\alpha$ -Zielgen ist der Glucose-Transporter 1 (GLUT1), ein membrangebundenes Glykoprotein, welches die hypoxischen Zellen des Tumors mit Glukose versorgt. Die intrazelluläre Glukose wird anschließend durch glykolytische Enzyme, wie die Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK-1) verstoffwechselt.

Die immunhistochemische Färbung von GLUT1 ergab in Tumoren beider Genotypen einen gleichhohen Prozentsatz an GLUT1-positiver Fläche. Die Behandlung mit DETA-NO zeigte keine wesentlichen Veränderungen (Abbildung 4.10 A und B). Auf mRNA-Ebene jedoch zeigt sich, dass die DETA-NO-Gabe in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäusen im Gegensatz zu den NaCl-behandelten Tieren einen deutlichen Anstieg von GLUT1 hervorruft. Die HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Tiere weisen dagegen sowohl unbehandelt also auch behandelt deutlich weniger GLUT1 auf. Die mRNA-Expression von GLUT1 korreliert mit den in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Expression von HIF-1 $\alpha$ .

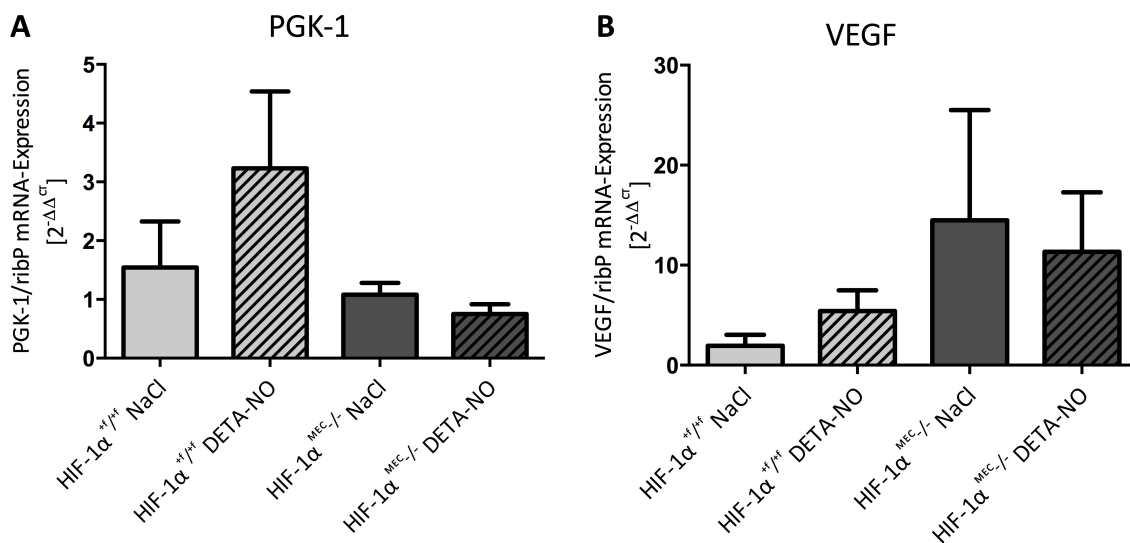


**Abbildung 4.10: Vergleichbarer Proteingehalt an GLUT1 in Tumoren, aber deutlich reduzierte mRNA-Expression in den Tumoren der HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup>-Mäuse.** A: Repräsentative immunhistochemische Färbung von GLUT1. B: Quantifizierung GLUT1-positiver Fläche. C: Quantitative Bestimmung von GLUT1 auf mRNA-Ebene mittels Realtime-PCR. HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM. Maßstabsskala entspricht 50  $\mu$ m. P  $\leq$  0,01.



#### 4.3.4 Weitere HIF-1 $\alpha$ -Zielgene

Des Weiteren wurden die PKG-1 und VEGF als HIF-1-Zielgene untersucht. Die mRNA-Expression von PKG-1 in den Tumoren zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie Expression von HIF-1 $\alpha$ , PHD2, und GLUT1. Unter dem Einfluss von DETA-NO stieg die Expression von PKG-1 in Tumoren HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse, im Gegensatz zu den mit NaCl behandelten Tieren, auf das Doppelte an, während in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{\text{MEC}/-}$ -Mäuse deutlich weniger an PKG-1 exprimiert wurde (Abbildung 4.11 A).

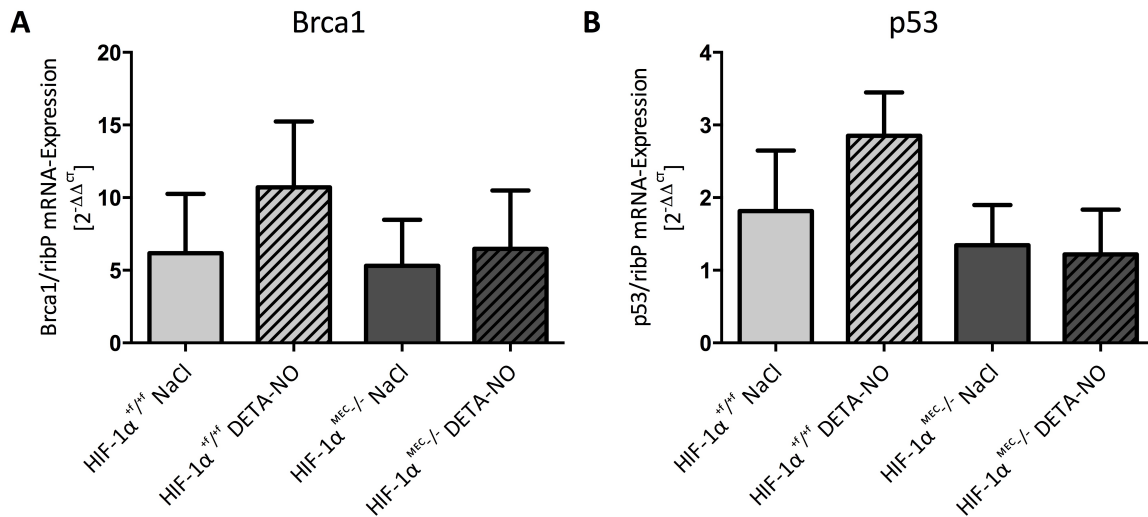


**Abbildung 4.11: PKG-1 wird in den HIF-1 $\alpha^{\text{MEC}/-}$ -Tumoren weniger exprimiert.** Quantitative Analyse der Genexpression in Tumoren mittels Realtime-PCR. HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha^{\text{MEC}/-}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{\text{MEC}/-}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Analyse der Genexpression von VEGF als HIF-1-Zielgen zeigte, dass in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{\text{MEC}/-}$ -Mäuse höhere Expressionslevel erreicht wurden als in den Tumoren, in denen das HIF-1 $\alpha$  nicht in den Brustepithelzellen ausgeschaltet wurde. Unter NO-Behandlung stiegen die mRNA-Level von VEGF zwar in diesen Tumoren an, dennoch scheint HIF-1 $\alpha$  nicht der alleinige Regulator von VEGF in diesen Tumoren zu sein (Abbildung 4.11 B).

#### 4.4 Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts auf Tumorsuppressorgene

Des Weiteren wurden die Tumorsuppressorgene Brca1 und p53 untersucht. In Abbildung 4.12 A ist die Genexpression von Brca1 aufgeführt. Während in den beiden Genotypen unter NaCl-Behandlung die Genexpression in den Tumoren in etwa gleich war, wurde in den DETA-NO behandelten Mäusen tendenziell eine gesteigerte Expression von Brca1 festgestellt.



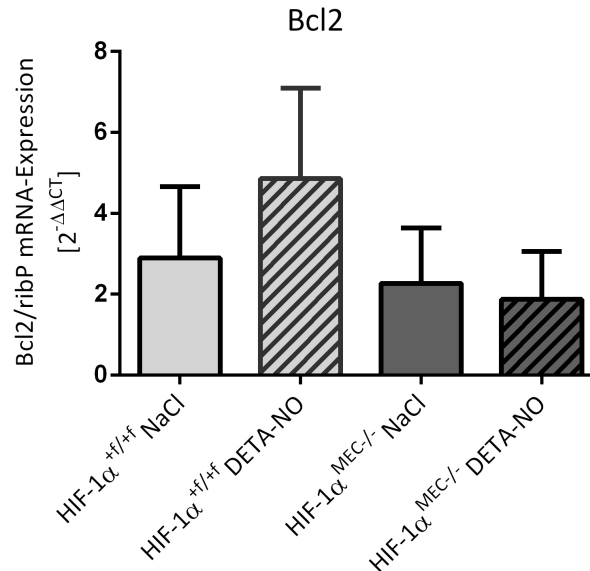
**Abbildung 4.12: Gesteigerte Brca1-Genexpression unter NO-Einfluss und erhöhte p53-Expression in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ -Mäuse.** Quantitative Analyse der Genexpression in Tumoren mittels Realtime-PCR. HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$  DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ -Mäuse wurde generell eine höhere Expression des Tumorsuppressorgens p53 festgestellt. Durch die Injektionen mit DETA-NO wurde die Expression verstärkt. In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/}$ -Mäuse hingegen blieb die Expression von p53 auf gleichem Niveau (Abbildung 4.12 B).

Neben den p53 wurde auch Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*) untersucht, welches in der Literatur als Verbindung zwischen Apoptose und Krebs gesehen wird und Apoptose von Tumorzellen eher verhindert als deren Proliferation fördert (Cory & Adams 2002; Vaux et al. 1988).

Ähnlich wie die Expression von p53 verhielt sich auch die Genexpression von Bcl2. In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/}$ -Mäuse war das Expressionslevel unabhängig der Behandlung auf gleichem Level und leicht reduziert im Gegensatz zu den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ -Mäusen, die

Injektionen mit NaCl bekamen. Dagegen resultierte die Gabe von DETA-NO bei HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäusen in einer gesteigerten Expression von Bcl2 (Abbildung 4.13).



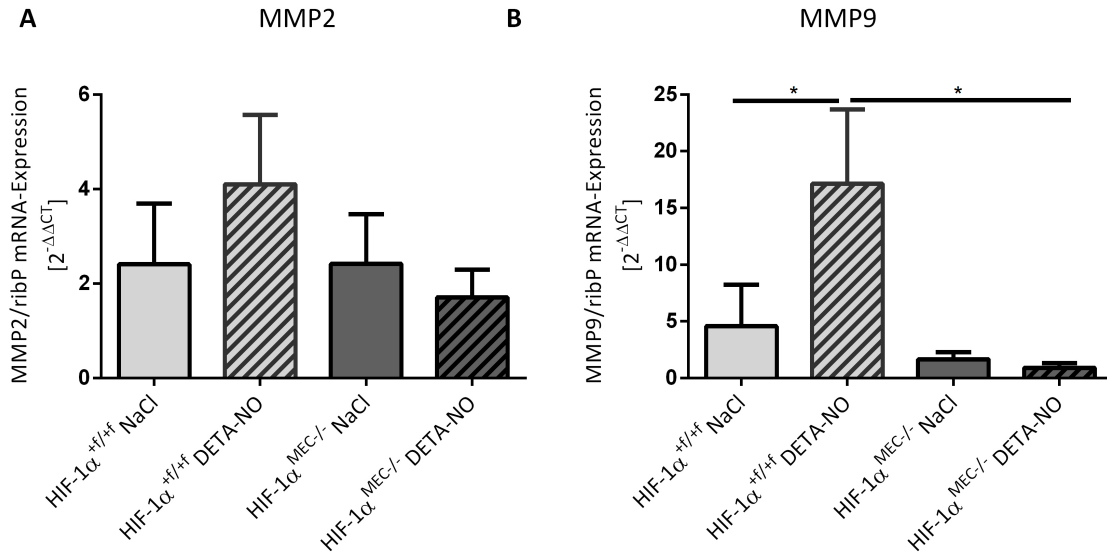
**Abbildung 4.13: Bcl2-Expression in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse geringer als in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse.** Quantitative Analyse der Genexpression in Tumoren mittels Realtime-PCR. HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 4.5 Rolle der Metalloproteinasen

Die zwei Metalloproteinasen (MMP) 2 und 9 werden in angiogenen Läsionen vermehrt exprimiert. Die Abwesenheit von MMP2 beeinflusst nicht die Induktion der Angiogenese, verzögert jedoch das Tumorwachstum. Die HIF-1 $\alpha$ -abhängige MMP9 ist in der Lage, normale Zellinseln durch die Freisetzung von VEGF die Angiogenese voranzutreiben (Bergers et al. 2000; Schelter et al. 2010).

In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse wurde sowohl MMP2 als auch MMP9 vermehrt exprimiert. Unter Einfluss von DETA-NO erhöhte sich das Expressionslevel beider MMPs. In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse wurde die Expression von MMP2 mit DETA-NO sogar noch weiter reduziert, hingegen blieb die Expression von MMP9 in diesen Tumoren

unabhängig von der Behandlung auf gleich signifikant niedrigerem Niveau im Vergleich zu den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäusen (Abbildung 4.14).

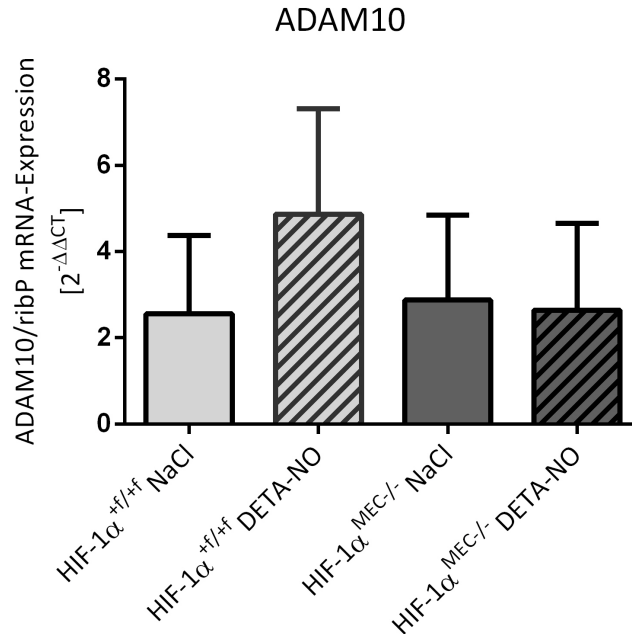


**Abbildung 4.14: DETA-NO erhöht die Expression von MMP2 und MMP9 in HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäusen.**

Quantitative Analyse der Genexpression in Tumoren mittels Realtime-PCR. HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Von weiterem Interesse war die Disintegrin- und Metalloproteinase ADAM10. ADAMs sind multifunktionale, membrangebundene Glykoproteine auf der Zelloberfläche und übernehmen wichtige Funktionen in Zellwachstum, Differenzierung und Motilität (Lendeckel et al. 2005). Barsoum et al. (2011) zeigten, dass die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Überexpression von ADAM10 in Prostata- und Brustkrebszellen zur Immunevasion beiträgt.

Die Abbildung 4.15 zeigt die Expression von ADAM10. In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse war die Expression, unabhängig der Behandlung, gleich stark ausgeprägt, vergleichbar mit den Tumoren der mit NaCl-behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse. Die Gabe von DETA-NO resultierte in einer gesteigerten ADAM10-Expression.



**Abbildung 4.15: Gesteigerte Expression von ADAM10 in Tumoren der HIF-1α<sup>+/+</sup>-Mäuse durch DETA-NO.** Quantitative Analyse der Genexpression in Tumoren mittels Realtime-PCR. HIF-1α<sup>+/+</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>+/+</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte ± SEM.

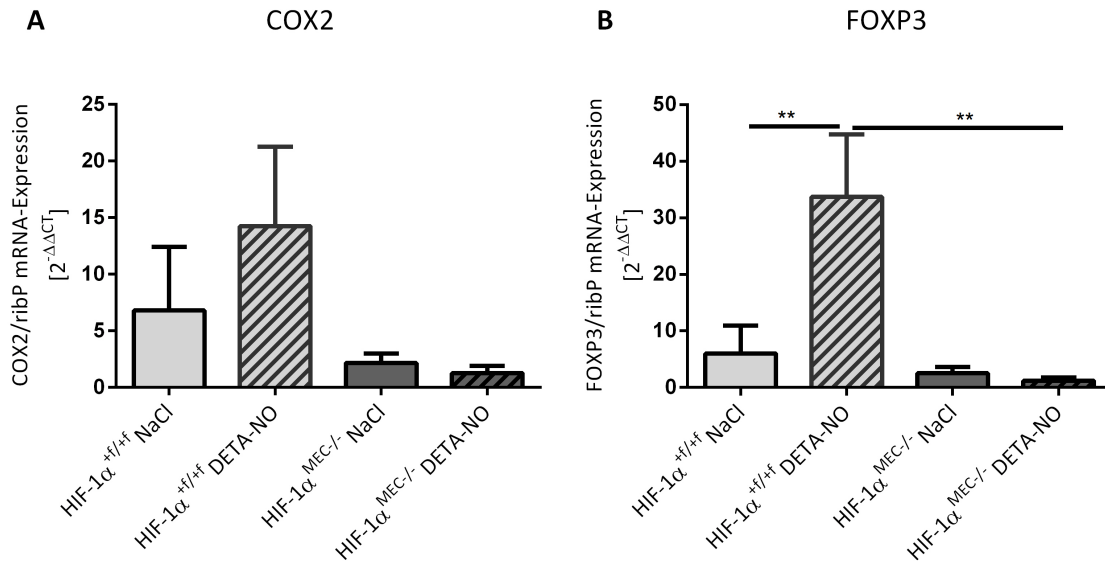
#### 4.6 Gesteigerte Expression der Entzündungsfaktoren COX2 und FOXP3 mit DETA-NO-Behandlung

Basierend auf humanen Studien und Tiermodellen wird die induzierbare Cyclooxygenase (COX) 2 in der Literatur mit verschiedenen Krebsarten, unter anderem auch Mammatumoren, verknüpft. Die erhöhte Expression von COX2 korreliert mit Parametern, welche die Aggressivität des Tumors belegen (Arun & Goss 2004). Während die gezielte Überexpression von COX2 im Brustepithel die Tumorbildung induziert (Liu et al. 2001), verringert die Hemmung oder Deletion von COX2 die Tumorzinzidenz von Mammatumoren (Howe et al. 2005; Lanza-Jacoby et al. 2003).

Die Expression von COX2 war in den Tumoren der HIF-1α<sup>MEC-/-</sup>-Mäuse wesentlich geringer als in den Tumoren der HIF-1α<sup>+/+</sup>-Mäusen. Durch die Gabe von DETA-NO wurde die Expression von COX2 in den Tumoren der HIF-1α<sup>+/+</sup>-Mäuse noch deutlich gesteigert (Abbildung 4.16 A).



Shimizu et al. (2010) beobachteten eine positive Korrelation zwischen tumorinfiltrierten FOXP3 (*Forkhead box P3*)-positiven Lymphozyten und der COX2-Expression. Diese Verbindung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 4.16 B).



**Abbildung 4.16: Erhöhte Expression von COX2 und FOXP3 in HIF-1α<sup>+/+</sup>-Tumoren mit DETA-NO.**

Quantitative Analyse der in Tumoren mittels Realtime-PCR. HIF-1α<sup>+/+</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>+/+</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte ± SEM.

Die Expression von FOXP3 war signifikant höher in den Tumoren HIF-1α<sup>+/+</sup>-Mäusen unter DETA-NO-Einfluss, ebenso wie die Expression von COX2. In den Tumoren der HIF-1α<sup>MEC-/-</sup>-Tiere wurde, unabhängig der Behandlung, erheblich weniger FOXP3 festgestellt.

Krebszellen können die Anti-Tumor-Immunantwort durch hauptsächlich immunsuppressive T-Zellen, welche den Transkriptionsfaktor FOXP3 exprimieren, blockieren. FOXP3 positive regulatorische T-Zellen (Tregs) akkumulieren in neoplastischen Läsionen als Resultat verschiedener Mechanismen, wie verstärkte Infiltration, lokale Expansion und in situ Entwicklung von konventionellen T-Helferzellen. Nicht alle Tumorarten sind mit einer schlechten Prognose aufgrund einer hohen Anzahl an intratumoralen Tregs assoziiert, da sie auch immer in neoplastischen Läsionen mit anderen Zellen des Immunsystems, insbesondere T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen, zusammen agieren (Tanchot et al. 2013). Daher

war ein weiterer Teil dieser Arbeit den Einfluss von Immunzellen auf das Tumorstadium und die sekundären lymphatischen Organe hin zu untersuchen.

### 4.7 Einfluss des epithelialen HIF-1 $\alpha$ -KO und DETA-NO auf das Immunsystem

Tumore bestehen nicht nur aus einer autonomen Masse von mutierten Zellen, sondern sind vielmehr aus verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, Epithelzellen, Zellen des angeborenen (unspezifischen) sowie adaptiven Immunsystems zusammengesetzt (de Visser et al. 2006). Dabei werden den Zellen des angeborenen Immunsystems sowohl pro- als auch antitumorale Effekte zugeschrieben, der Induktion von Zellen des adaptiven Immunsystems jedoch Tumorstadium (Coussens et al. 2013; DeNardo et al. 2009). In den folgenden Kapiteln sollte ermittelt werden, ob und durch welche Zellen des Immunsystems die Tumorentwicklung in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäusen beeinflusst wurde.

Behandelte und unbehandelte Tumore der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse wurden nach Versuchsende entnommen und die daraus hergestellte Einzelzellsuspension mit Fluoreszenzantikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker der Immunzellen gefärbt.

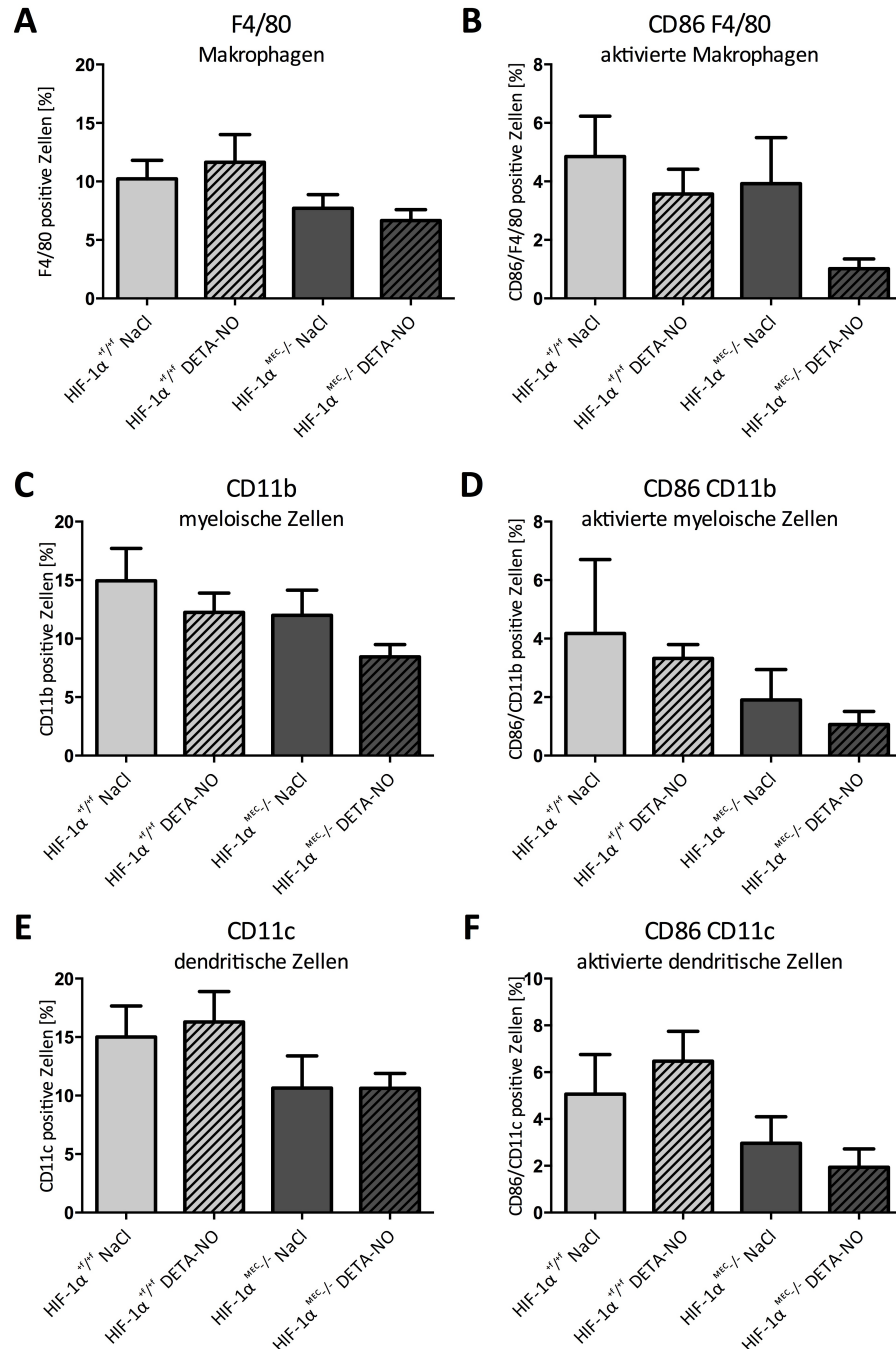
Die Quantifizierung der Immunzellinfiltrate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und der prozentuale Anteil der lebenden Zellen für den jeweiligen Oberflächenantikörper ermittelt.

#### 4.7.1 Rolle des angeborenen Immunsystems im Tumor

Lin et al. (2006) zeigten, dass die Induktion der Makrophageninfiltration in Tumoren des „PyMT-Modells“ bereits im prä-malignen Stadium beginnt und im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung progressiv ansteigt und somit die Angiogenese begünstigt (DeNardo et al. 2009).

Untersucht wurde die Einwanderung von Makrophagen (F4/80 $^{+}$ ), myeloischen (CD11b $^{+}$ ) und dendritischen Zellen (CD11c $^{+}$ ) sowie deren Status mit dem Aktivierungsmarker CD86. In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse wurden weniger Makrophagen ermittelt als in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren. Dementsprechend war auch die Anzahl der aktivierten Makrophagen niedriger.

Wesentlich, jedoch nicht signifikant, niedriger waren nur die Anzahl der aktivierten Makrophagen in den mit DETA-NO behandelten HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Tieren (Abbildung 4.17 A und B).

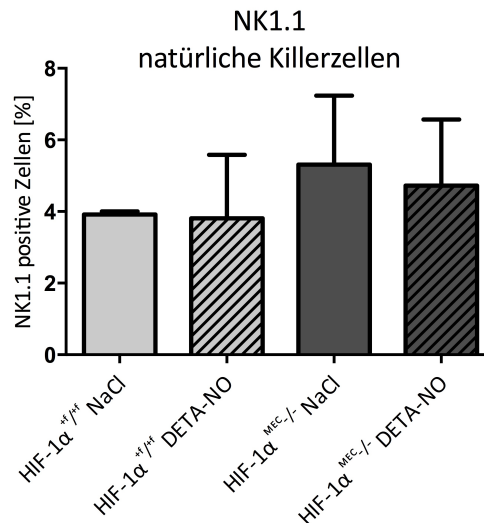


**Abbildung 4.17: Durchflusszytometrische Bestimmung der Immunzellinfiltrate des angeborenen Immunsystems in Tumoren.** Die Tumorzellen wurden zur Charakterisierung mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. A/B: Prozentualer Anteil an F4/80- und CD86/F4/80-positiven Zellen. C/D: Prozentualer Anteil an CD11b- und CD86/CD11b-positiven

Zellen. E/F: Prozentualer Anteil an CD11c- und CD86/CD11c-positiven Zellen. HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse wurden, im Gegensatz zu den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tumoren, weniger myeloische Zellen detektiert. Unter Behandlung mit DETA-NO war der Prozentsatz an CD11b-positiven Zellen in beiden Gruppen etwas niedriger. Ähnliches wurde bei den aktivierten myeloischen Zellen vorgefunden (Abbildung 4.17 C und D). Die Analyse der dendritischen Zellen ergab etwa 5 % weniger CD11c positive Zellen in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse und keine Veränderung unter DETA-NO-Gabe, während sie in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tumoren eine leicht erhöhte Prozentzahl an dendritischen Zellen aufzeigte. Dementsprechend waren auch mehr aktivierte dendritische Zellen in diesen Genotypen zu finden (Abbildung 4.17 E und F).

Des Weiteren wurden die Tumore auf das Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem, den NK-Zellen, untersucht. Die durchflusszytometrische Auswertung ergab hier, dass in den Tumoren mit epithelialem HIF-1 $\alpha$ -KO unabhängig von der Behandlung mehr NK-Zellen eingewandert waren (Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18: In Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse tendenziell mehr NK-Zellen.** Die Tumorzellen wurden zur Charakterisierung der NK-Zellen mit dem spezifischen Antikörper NK.1.1 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

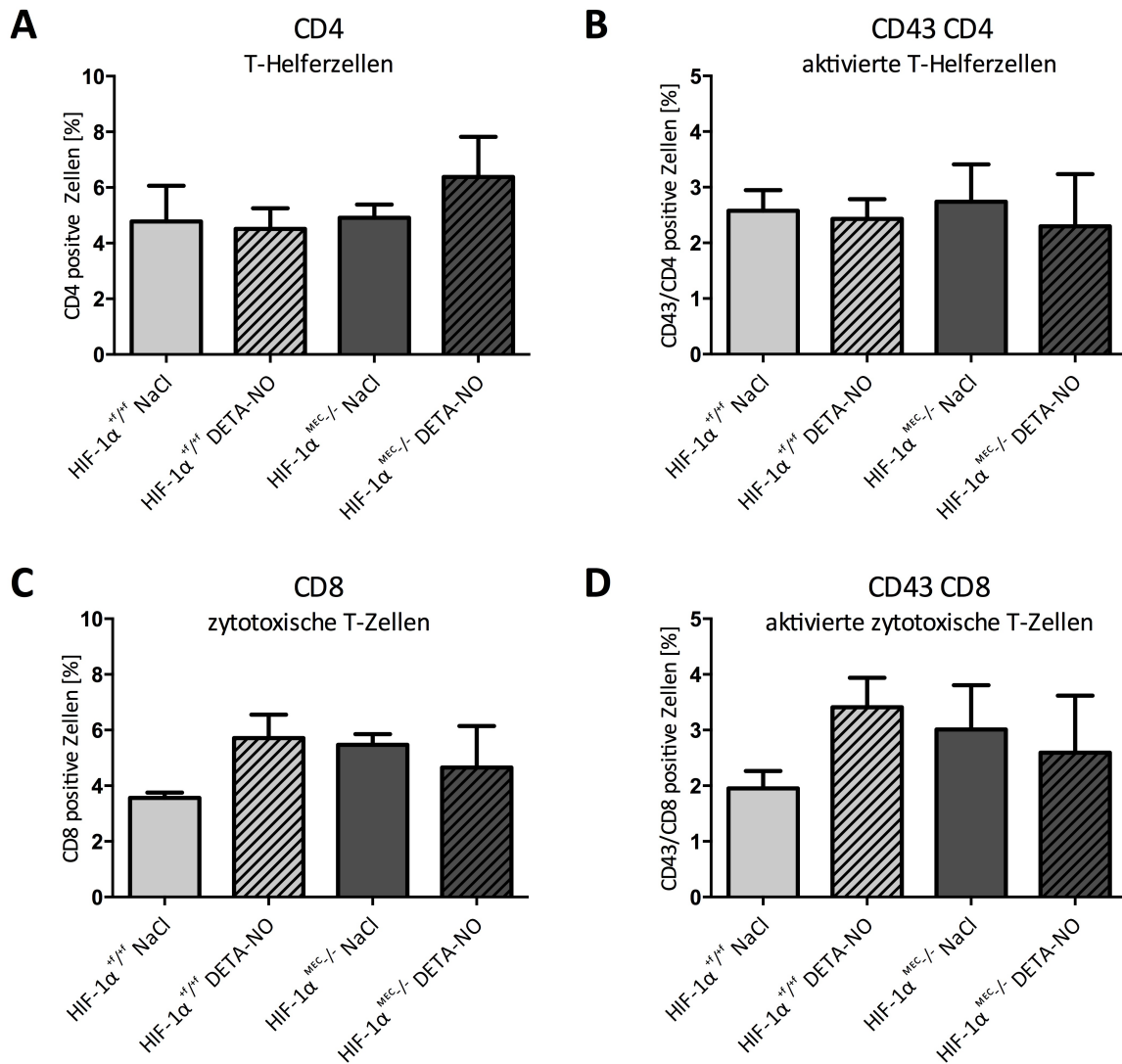
Auf Grund dieser Charakterisierung der infiltrierten Zellen der angeborenen Immunantwort, die keinen eindeutigen Schluss auf die Rolle des Knockouts oder der Behandlung von NO zulassen, galt das weitere Interesse den Zellen des adaptiven Immunsystems.

### 4.7.2 Rolle des adaptiven Immunsystems im Tumor

Die Charakterisierung der adaptiven Immunzellen erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) und gegen zytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$ ) sowie deren Aktivierungsmarker CD43.

Im Gegensatz zu den Zellen des angeborenen Immunsystems wurden etwa 10 % weniger Zellen des adaptiven Immunsystems detektiert. In den Tumoren der  $HIF-1\alpha^{+f/+f}$ -Mäuse wurden unabhängig der Behandlung rund 4,5 %  $CD4$ -positive Zellen ermittelt, ebenso in den Tumoren der  $HIF-1\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse mit NaCl Behandlung. Lediglich bei den  $HIF-1\alpha^{MEC-/-}$ -Tumoren unter NO Einfluss konnten etwa 6 % T-Helferzellen detektiert werden. Der Aktivierungsstatus war in allen Gruppen ähnlich und lag bei rund 2-3 % (Abbildung 4.19 A und B).

Die  $HIF-1\alpha^{+f/+f}$ -Tumore (NaCl) wiesen mit rund 3,5 % den geringsten Prozentsatz an infiltrierten T-Helferzellen auf. In den anderen Gruppen konnten 4,5-6 % an zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen werden. Auch hier waren in etwa die Hälfte aller  $CD8$ -positiven Zellen aktiviert (Abbildung 4.19 C und D).



**Abbildung 4.19: Durchflusszytometrische Bestimmung der Immunzellinfiltrate des adaptiven Immunsystems in Tumoren.** Die Tumorzellen wurden zur Charakterisierung mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. A/B: Prozentualer Anteil an CD4- und CD43/CD4-positiven Zellen C/D: Prozentualer Anteil an CD8- und CD43/CD8-positiven Zellen. HIF-1α<sup>+/+</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>+/+</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte ± SEM.

#### **4.7.3 Einfluss von des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts und DETA-NO auf die sekundären lymphatischen Organe**

Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen unter anderem Lymphknoten, Milz, Tonsille und Lymphfollikel. In diesen Organen findet der Antigenkontakt, im Lymphknoten über die Lymphe oder umliegendes Gewebe und in der Milz über das Blut, statt. Ebenso wird die klonale Vermehrung der Effektor- und Regulator-Lymphozyten angeregt.

Aus den regionalen Lymphknoten und der Milz wurden Einzelsuspensionen hergestellt und diese mit spezifischen Antikörpern markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Untersucht wurden auch hier die Makrophagen, myeloische und dendritische Zellen sowie NK-Zellen und T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen.

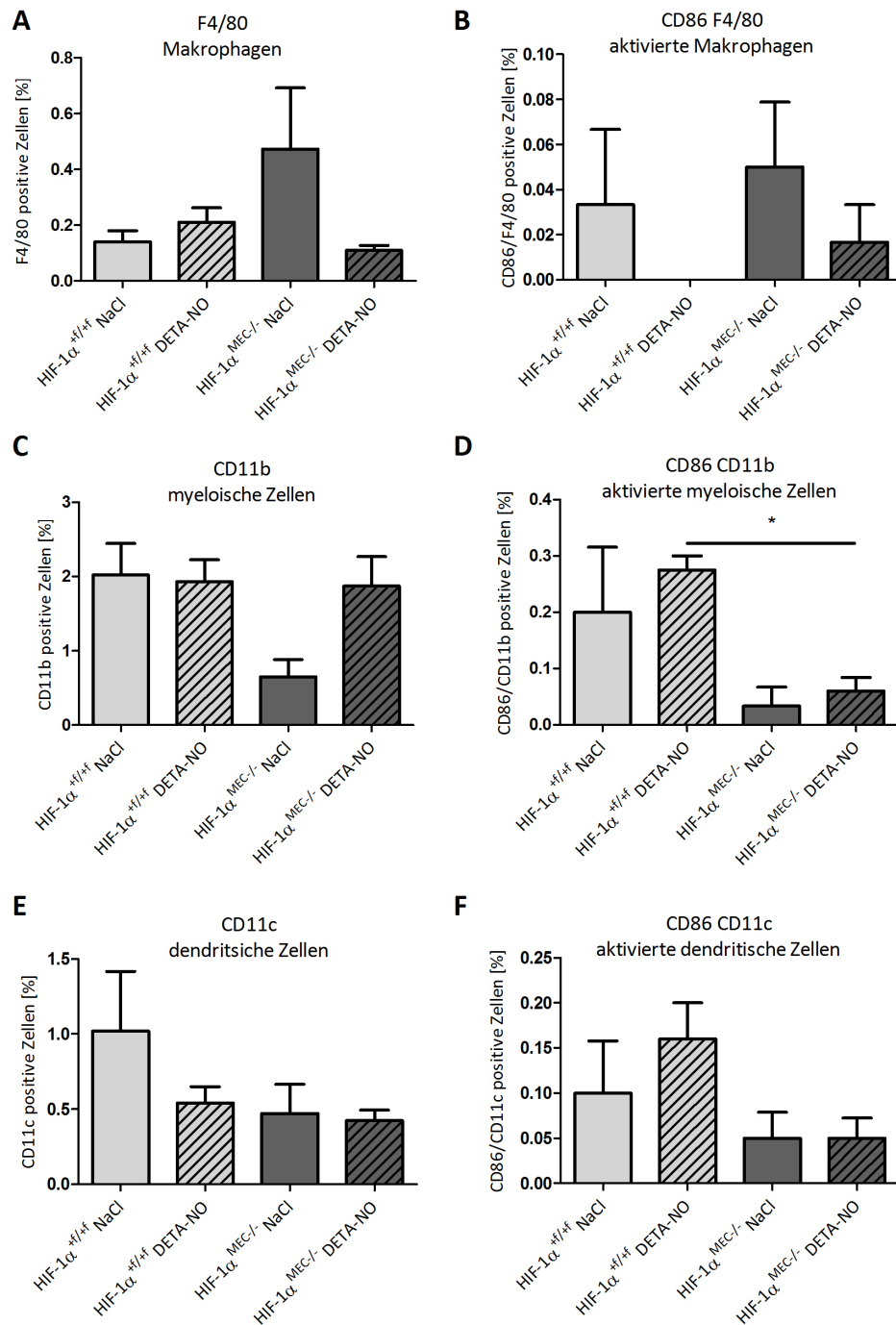
##### **4.7.3.1 Eingewanderte Immunzellen in regionale Lymphknoten**

Grundsätzlich wurden in den Zellen der regionalen Lymphknoten vor allem myeloische Zellen, gefolgt von dendritischen Zellen und nur wenige Makrophagen (Abbildung 4.20) detektiert. Die Lymphknoten der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse wiesen unabhängig der Behandlung etwa 0,2 % an Makrophagen auf, wovon bei den mit NaCl-behandelten etwas mehr als 10 % aktiviert waren. Dagegen konnten bei den mit DETA-NO-behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäusen keine aktivierten Makrophagen gefunden werden. In den Lymphknoten der mit NaCl-behandelten HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse wurden mehr als 0,4 % Makrophagen detektiert, mit DETA-NO sank der Wert um die Hälfte. Der Prozentsatz an aktivierten Makrophagen liegt auch in diesen beiden Gruppen bei rund 10 % (Abbildung 4.20 A und B).

In den Lymphknoten der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse, sowohl mit NaCl also auch mit DETA-NO, wurden ca. 2 % myeloische Zellen detektiert, welche zu 10-15 % aktiviert waren. Die Lymphknoten der mit DETA-NO behandelten HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse wiesen ebenfalls rund 2 % myeloische Zellen auf, die Lymphknoten der mit NaCl-behandelten HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Tieren jedoch unter 1 % myeloische Zellen. Obwohl die Lymphknoten der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse (DETA-NO) genauso so viele myeloische Zellen aufwiesen wie die der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse (DETA-NO) wurden signifikant weniger aktivierte Zellen gefunden (Abbildung 4.20 C und D).

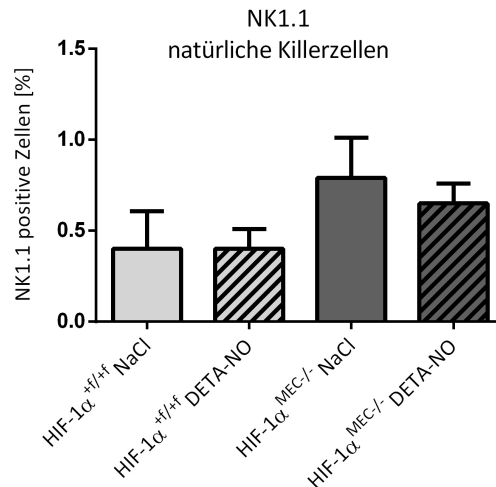
Die Analyse der dendritischen Zellen ergab, dass die HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäuse (NaCl) in ihren Lymphknoten im Mittel etwa 1 % Zellen aufwiesen, alle anderen Gruppen annähernd die Hälfte. In den Lymphknoten der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere (DETA-NO) wurde mit 0,15 % der höchste Prozentsatz an aktivierten dendritischen Zellen ermittelt.





**Abbildung 4.20: Zellen des angeborenen Immunsystems in den regionalen Lymphknoten.** Die Zellen der Lymphknoten wurden zur Charakterisierung mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. A/B: Prozentualer Anteil an F4/80- und CD86/F4/80-positiven Zellen. C/D: Prozentualer Anteil an CD11b- und CD86/CD11b-positiven Zellen. E/F: Prozentualer Anteil an CD11c- und CD86/CD11c-positiven Zellen. HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>+f/+f</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha$ <sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Analyse der NK-Zellen ergab, ähnlich wie in den Tumoren (vgl. Abbildung 4.18) eine vermehrte Einwanderung in die Lymphknoten der  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäuse, unabhängig der Behandlung (Abbildung 4.21).

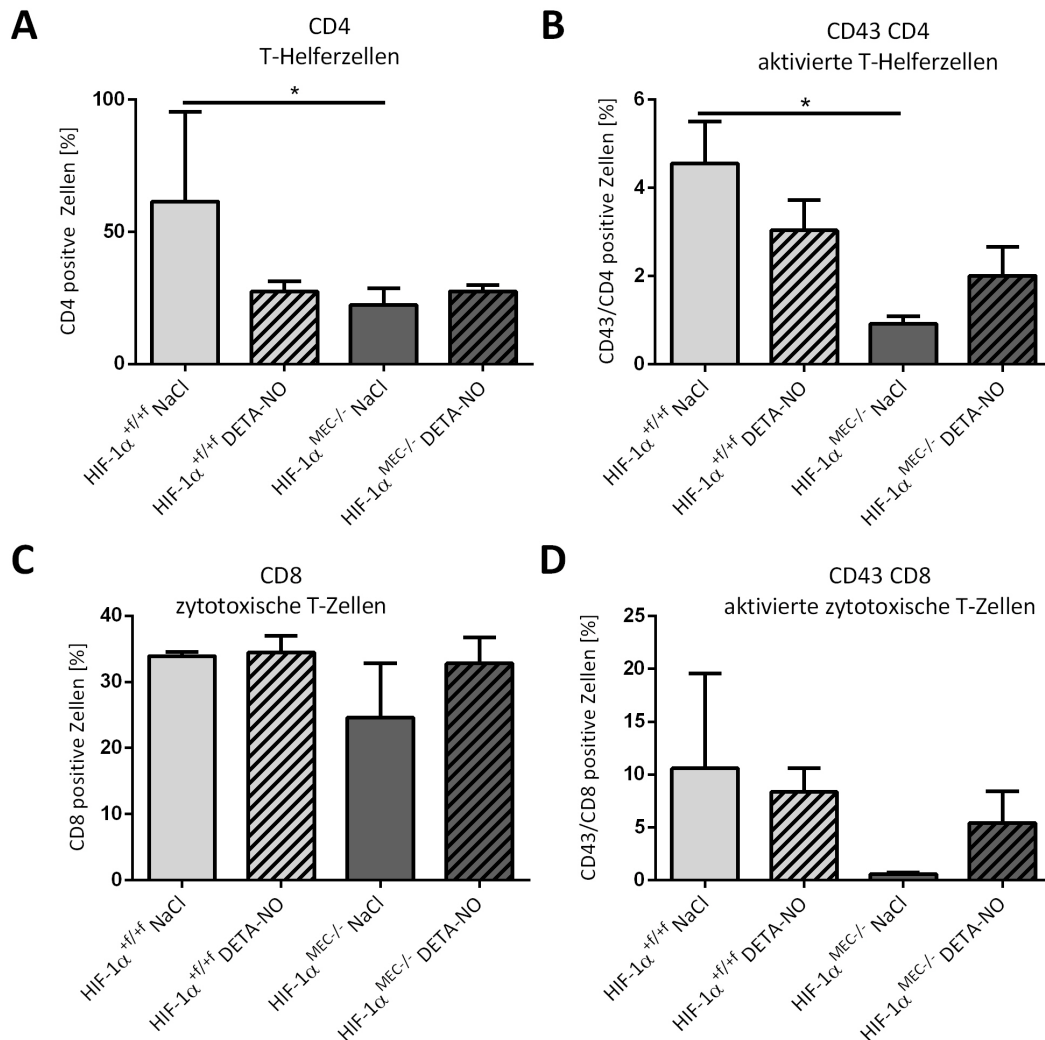


**Abbildung 4.21: Erhöhte NK-Zellen Infiltration in den Lymphknoten der  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäuse.** Die Zellen der Lymphknoten wurden zur Charakterisierung der NK-Zellen mit dem spezifischen Antikörper NK.1.1 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$  NaCl: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Im Gegensatz zu den adaptiven Immunzellinfiltraten in den Tumoren (s. Abbildung 4.19) wurden in den Lymphknoten wesentlich mehr Zellen registriert. In dem Lymphknoten der mit NaCl-behandelten  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tiere wurden mehr als 60 % positive T-Helferzellen gefunden, das sind etwa 40 % mehr als in den Lymphknoten der NaCl-behandelten  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäuse. Die DETA-NO-Behandlung führte in den Lymphknoten der  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tiere zu einer Reduktion der T-Helferzellen auf etwa 27 %. Genauso viele positive Zellen wurden auch in den  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Tieren gefunden. Allerdings konnten nur wenige T-Helferzellen als aktivierte Zellen identifiziert werden. In den Lymphknoten der  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Mäuse konnten 4,5 % (NaCl) und 3 % (DETA-NO), in denen der  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäuse 1 % (NaCl) bzw. 2 % (DETA-NO) aktivierte T-Helferzellen erfasst werden (Abbildung 4.22 A und B).

Bei der Infiltration der zytotoxischen T-Zellen in die Lymphknoten der  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Mäuse konnten unabhängig der Behandlung ca. 34 % CD8-positive Zellen detektiert werden, ebenso

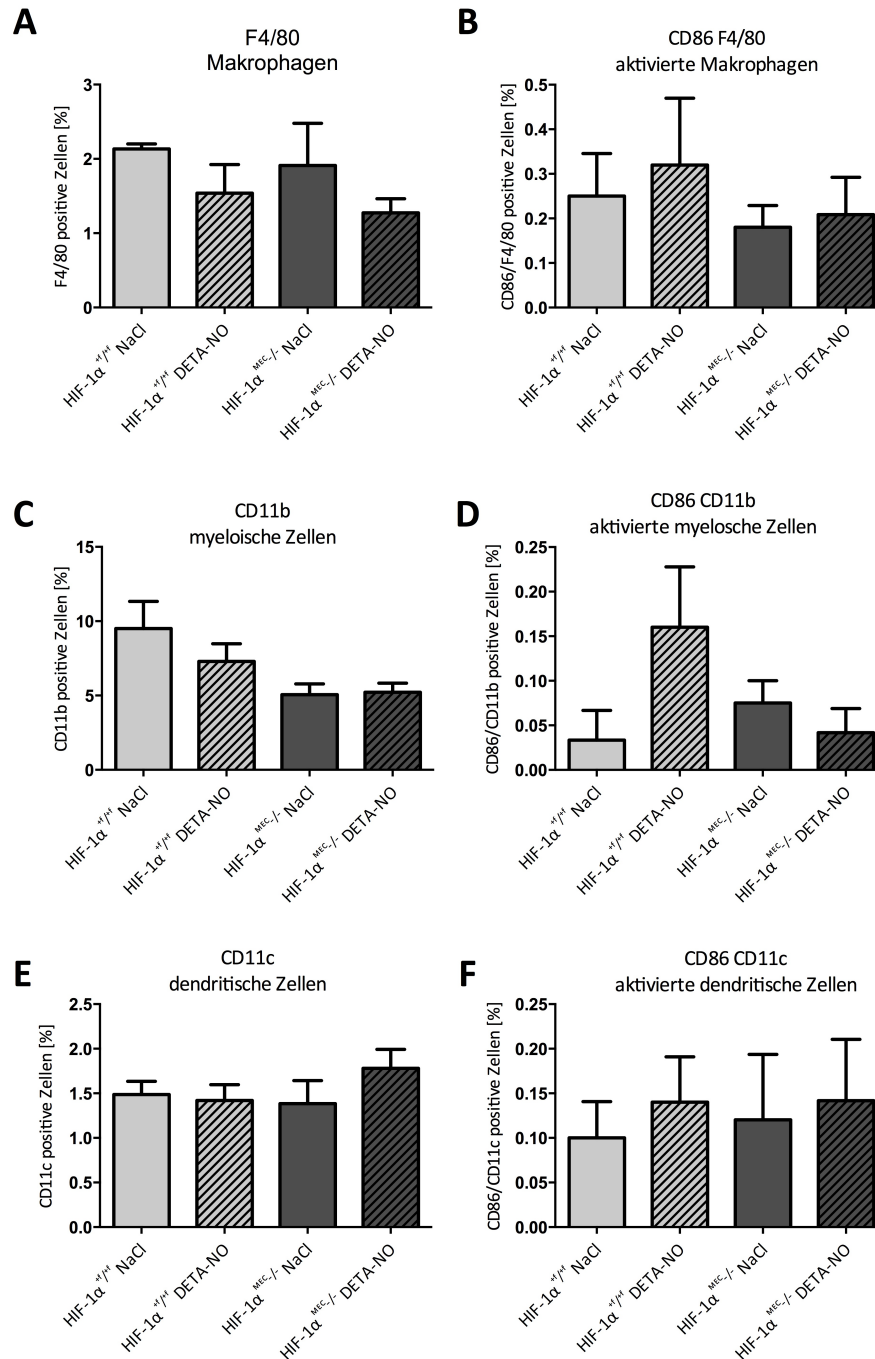
in den Lymphknoten der mit DETA-NO behandelten  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäusen. Lediglich die Lymphknoten der mit NaCl-behandelten  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäuse wiesen 24 % zytotoxische T-Helferzellen auf. In dieser Gruppe wurden auch die wenigsten, nämlich 0,6 % aktivierte zytotoxische T-Zellen ermittelt (Abbildung 4.22 C und D).



**Abbildung 4.22: Zellinfiltrate des adaptiven Immunsystems im Lymphknoten.** Die Zellen des Lymphknotens wurden zur Charakterisierung mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. A/B: Prozentualer Anteil an CD4- und CD43/CD4-positiven Zellen C/D: Prozentualer Anteil an CD8- und CD43/CD8-positiven Zellen.  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$  NaCl: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC-/-}}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 4.7.3.2 Infiltrierte Immunzellen in der Milz

Die Abbildung 4.23 zeigt die eingewanderten Zellen des angeborenen Immunsystems in der Milz. Die Milzen der mit NaCl-behandelten Mäuse sowohl HIF-1 $\alpha^{+/+}$  als auch HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  wiesen im Mittel 2 % an Makrophagen auf, unter NO-Einfluss war der Prozentsatz an Makrophagen jeweils geringer. Jedoch waren in den Milzen der DETA-NO behandelten Tiere, im Vergleich zu den mit NaCl behandelten, tendenziell mehr aktivierte Makrophagen zu finden (Abbildung 4.23 A und B). Die Analyse der myeloischen Zellen ergab, dass in den Milzen der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse, unabhängig der Behandlung, mehr, nämlich etwa 5 % positive Zellen ermittelt wurden, in den Milzen der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse mit NaCl-Applikation 10 % und mit DETA-NO rund 7 %.

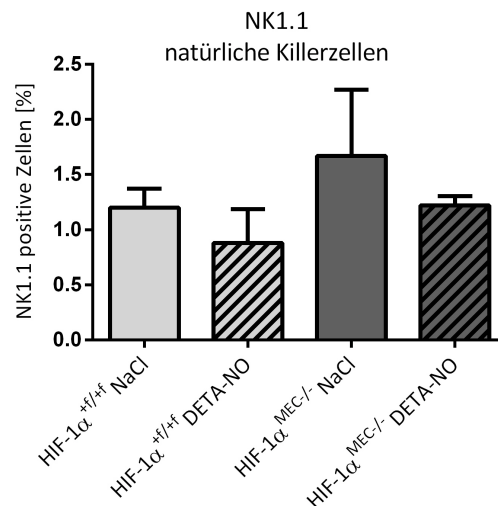


**Abbildung 4.23: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellinfiltrate des angeborenen Immunsystems in der Milz.** Die Milzzellen wurden zur Charakterisierung mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. A/B: Prozentualer Anteil an F4/80- und CD86/F4/80-positiven Zellen. C/D: Prozentualer Anteil an CD11b- und CD86/CD11b-positiven Zellen. E/F: Prozentualer Anteil an CD11c- und CD86/CD11c-positiven Zellen. HIF-1α<sup>+/+</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>+/+</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 6, Mittelwerte ± SEM.

Die durchflusszytometrische Bestimmung der aktivierten myeloischen Zellen ergab, dass in die Milzen der mit DETA-NO-behandelten  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Mäuse mit 0,16 % die meisten aktivierten myeloischen Zellen eingewandert waren, hingegen in die der mit NaCl-behandelten Mäuse nur 0,03 %. Die Milzen der  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC}/-}$ -Mäuse wiesen mit NaCl 0,075 % und mit DETA-NO 0,04 % aktivierte myeloische Zellen auf (Abbildung 4.23 C und D).

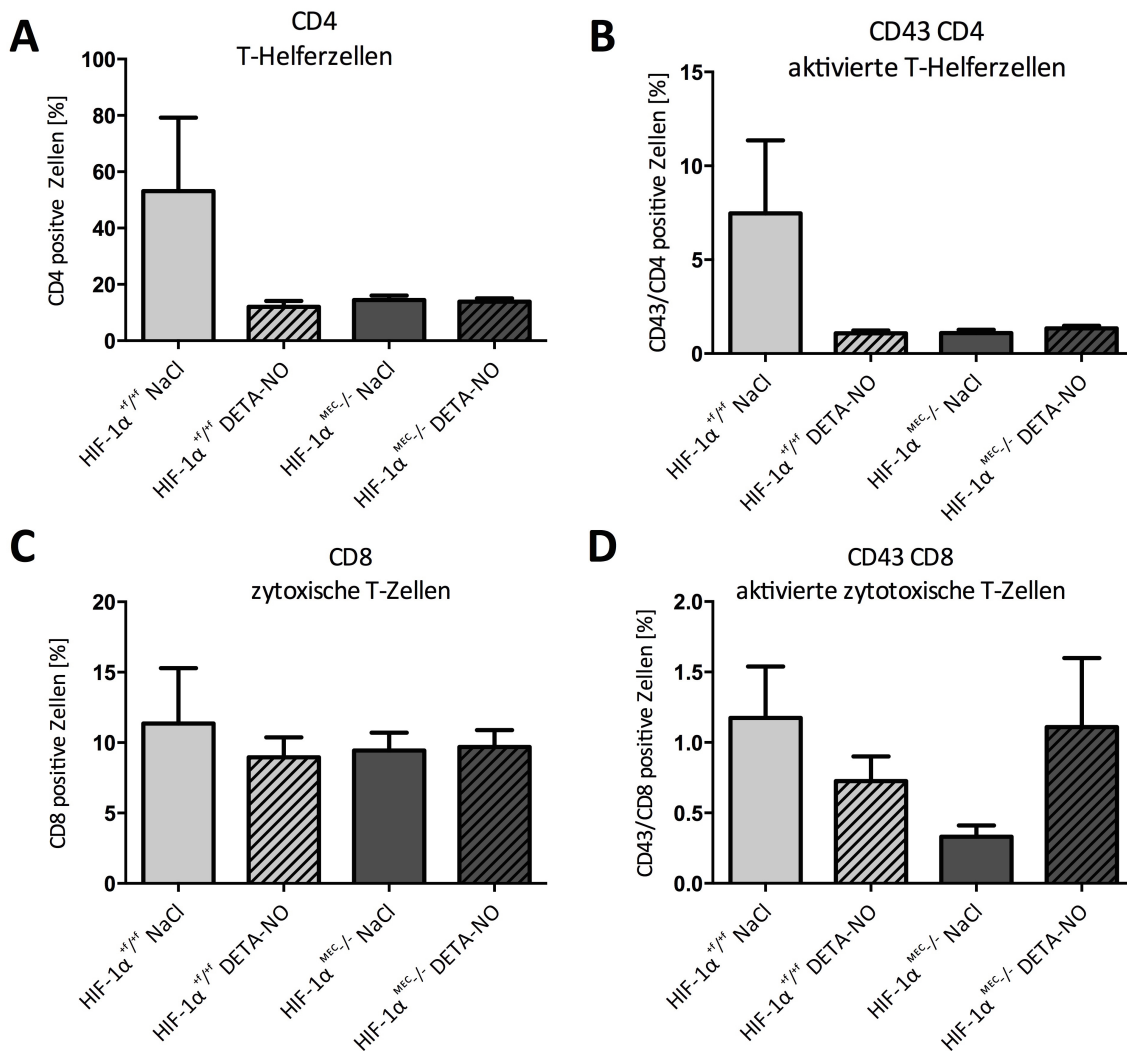
Die Abbildung 4.23 E zeigt die Einwanderung der dendritischen Zellen in die Milzen. Im Mittel wurden etwa 1,5 % dendritische Zellen in den Milzen der  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Mäuse unabhängig der Behandlung und in den Milzen der  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC}/-}$ -Mäuse mit NaCl-Behandlung ermittelt. In den Milzen der  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC}/-}$ -Mäuse wurden 1,8 % positiven Zellen ermittelt. Der Aktivierungsstatus der dendritischen Zellen war in allen Gruppen annähernd gleich und lag bei 1,4 – 1,8 % (Abbildung 4.23 F)

Auch die Milzen wurden auf die NK-Zellen hin untersucht. Wie in Abbildung 4.24 ersichtlich, waren in die Milzen der  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Mäuse weniger NK-Zellen eingewandert als in die Milzen der  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC}/-}$ -Mäuse. Die Behandlung mit DETA-NO führte in beiden Genotypen tendenziell zu weniger, wenngleich auch nicht signifikant, infiltrierten NK-Zellen.



**Abbildung 4.24: DETA-NO vermindert die Einwanderung von NK-Zellen in die Milz.** Die Milzzellen wurden zur Charakterisierung der NK-Zellen mit dem spezifischen Antikörper NK.1.1 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC}/-}$  NaCl: n = 5,  $\text{HIF-1}\alpha^{\text{MEC}/-}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In den Milzen der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse (NaCl) wurden mit 53 % erheblich mehr T-Helferzellen ermittelt als in den anderen Gruppen. Ebenso konnten deutlich mehr aktivierte T-Helferzellen detektiert werden (7,5 %). Die Behandlung mit DETA-NO führte in den Milzen der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu 11,9 % eingewanderten T-Helferzellen, welche zu 1 % aktiviert waren. Bei den Milzen der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse waren sowohl in der Anzahl der T-Helferzellen also auch ihrem Aktivierungsstatus keine Unterschiede erkennbar. Es wurden im Mittel 14 % der Zellen als T-Helferzellen identifiziert und 1 – 1,3 % waren auch für den Aktivierungsmarker positiv (Abbildung 4.25 A und B).



**Abbildung 4.25: Zellen des adaptiven Immunsystems in der Milz.** Die Milzzellen wurden zur Charakterisierung mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

A/B: Prozentualer Anteil an CD4- und CD43/CD4-positiven Zellen C/D: Prozentualer Anteil an CD8- und CD43/CD8-positiven Zellen. HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  NaCl: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  DETA-NO: n = 6, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Analyse der zytotoxischen T-Zellen (Abbildung 4.25 C und D) ergab ebenfalls erhöhte Werte in den Milzen der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse (NaCl), wenngleich die Differenz zu den anderen Gruppen hier bei etwa 2 % liegt und nicht wie bei den T-Helferzellen bei ca. 40 %.

Die Behandlung mit DETA-NO zeigte hinsichtlich des Aktivierungsstatus in den beiden Genotypen unterschiedliche Wirkung. In den Milzen der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse wurden die weniger zytotoxische T-Zellen aktiviert (0,7 %) im Gegensatz zu 1,2 % in den Milzen der mit NaCl-behandelten Tiere. Die Milzen der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse wiesen hingegen unter DETA-NO-Behandlung mit 1,1 %, im Gegensatz zu den Tieren mit NaCl (0,3 %) mehr aktivierte zytotoxische Zellen auf (Abbildung 4.25 C und D).



## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf das Tumorwachstum

Mehrere Studien zu HIF-1 in Brustkrebs haben eine Assoziation zwischen ungünstigem Krankheitsverlauf bzw. erhöhter Patientensterblichkeit und HIF-1 $\alpha$ -Überexpression ergeben. Bos et al. (2001) zeigten, dass eine Erhöhung der HIF-1 $\alpha$ -Expression in humanen primären Brusttumoren mit Fortschreiten des pathologischen Stadiums, d. h. erhöhter Proliferationsrate und Dedifferenzierung von Läsionen, einhergeht. Dies wiederum steht in engem Verhältnis zum aggressiven und invasiven Wachstum der Tumoren. Interessanterweise hängt die Prognose von Brustkrebspatienten jedoch auch davon ab, ob die HIF-1 $\alpha$ -Expression perinekrotisch oder diffus im gesamten Tumor auftritt (Vleugel et al. 2005). Um die Biologie der humanen Tumorprogression besser nachzuvollziehen, wird in der Literatur neben Xenograft-Modellen (Semenza 2003) vor allem das PyMT-Maus-Modell als dafür geeignet angesehen (Lin et al. 2003). In dieser Studie wurde daher das von Liao et al. (2007) vorgestellte PyMT-Mausmodell verwendet, welches einen spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Knockout in den Brustepithelzellen aufweist und autochthon Brusttumore entwickelt.

Aus eigenen Vorversuchen mit Mäusen mit einem reinem C57BL/BJ-Hintergrund und dem PyMT-Onkogen war bekannt, dass diese solide Brusttumore entwickeln und Metastasen in der Lunge bilden. Zur weiteren Untersuchung wurden für diese Studie Mäuse (HIF-1 $\alpha^{+/+}$  und HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ ) ab der 8. Generation auf C57BL/BJ zurückgekreuzt (vgl. Kapitel 3.2.2).

NO ist für die Tumorbilogie von Interesse, denn tumor-infiltrierende Makrophagen und tumor-assoziierte Fibroblasten exprimieren iNOS und dienen als Quelle für NO im Tumormikromilieu. In vielen humanen Brusttumoren wurden hohe NO-Synthase-Aktivitäten, vor allem in invasiven Tumoren, gefunden (Fukumura et al. 2006). Ellies et al. (2003) haben mit Experimenten an einem Mausmodell mit orthotopen Mammatumoren gezeigt, dass die Kommunikation zwischen Tumor und Wirt durch die Abwesenheit der iNOS gestört wird und in einem verzögerten Tumorwachstum resultiert. Berchner-Pfannschmidt et al. (2007) zeigte, dass die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Induktion der PHD2 durch NO das Sauerstoffsensing und die HIF-1-Zielgenexpression modulieren kann. Daher ist es vorstellbar, dass tumor-assoziiertes

NO die HIF-1-Antwort in Tumoren beeinflussen kann und dieser Effekt durch externe NO-Zufuhr wie durch den hier verwendeten NO-Donor DETA-NO ähnliche Effekte nach sich zieht. In einer klinischen Studie von Yasuda et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass die Gabe von NO-Donatoren die Effizienz der Bestrahlungstherapie erhöht und zu einem verminderten Tumorwachstum führt. In Zusammenhang dazu steht die reduzierte Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  in Tumorzellen und verminderter VEGF-Expression und die damit verbundene reduzierte Angiogenese. Als weitere Konsequenzen wurde das verminderte Tumorwachstum und niedrigere Metastasierungsverhalten angesehen. Mit dieser Studie sollte daher der Einfluss von DETA-NO und HIF in Brusttumoren untersucht werden.

Mit Beginn des Tumorwachstums wurde den Mäusen entweder alle drei Tage der NO-Donor DETA-NO oder NaCl intraperitoneal injiziert. Es wurden 80 mg/kg KG DETA-NO als Konzentration gewählt, da aus Vorversuchen (nicht gezeigte Daten) bekannt war, dass eine geringere Konzentration im Serum nicht zu nachweisbaren Konzentrationen an NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> führte, also auch nicht sicher war, dass ausreichend NO freigesetzt wurde. Bei einer Dosis von 80 mg/kg KG DETA-NO führte die Injektion jedoch zu einem signifikanten Anstieg der NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>-Konzentration nach 1 h, während nach 24 h und nach Ende des Versuchs die NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>-Werte das Basalniveau erreichten (vgl. Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3). *In vitro* ist für DETA-NO eine Halbwertszeit von 20 Stunden bei 37 °C und pH 7,4 angegeben (Huerta et al. 2008), dagegen existieren für *in vivo* keine Referenzwerte. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das freigesetzte NO, sichtbar nach 1 h, bereits nach 24 h einmaliger Gabe vollständig umgesetzt wurde. Dies lässt darauf schließen, dass DETA-NO *in vivo* eine wesentlich geringere Halbwertszeit hat als *in vitro* Daten vermuten lassen.

Der Verlust von HIF-1 $\alpha$  spielt bei der Tumorbildung keine Rolle, da sowohl HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - als auch HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse Tumore entwickelten. Dies steht im Gegensatz zu Befunden von Liao et al. (2007), die einen um 22 Tage verzögerten Tumorwachstumsbeginn in HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäusen feststellten. In der vorliegenden Arbeit entwickelten beide Gruppen im Mittel am 90. Tag die ersten tastbaren Tumore (vgl. Abbildung 4.4). Die Tumorgewichte bzw. -lasten ergaben am Endpunkt keine signifikanten Unterschiede, wenngleich das Gewicht bei den HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäusen etwas geringer war. Die Behandlung mit DETA-NO führte zu einer tendenziellen Erhöhung der Tumorgewichte bzw. -lasten in beiden Gruppen (vgl. Abbildung

4.5). Im Gegensatz zu Liao et al. (2007) konnten in dieser Studie keine Metastasen in der Lunge festgestellt werden. Ein Vorversuch mit Mäusen der 3. Generation C57BL/6J zeigte jedoch, dass dieses Modell durchaus Metastasen in der Lunge entwickelt (s. Kapitel 8.1.3 im Anhang). Schwab et al. (2012) und Hunter et al. (2003) beschreiben jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Metastasierungsverhalten und dem genetischen Hintergrund. Ob die ausbleibende Metastasierung alleine durch das Rückkreuzen auf C57BL/6J, durch das Alter der Mäuse oder durch eine Kombination aus beiden verursacht war, lässt sich an dieser Stelle nicht klären. Die Mäuse entwickelten bis zu 10 Tumore, die sich in ihrem Gewicht und Morphologie stark unterschieden. Es wurden daher immer Tumore möglichst gleicher Größe und Morphologie für die Aufarbeitung (Histologie, cDNA, FACS-Analyse) verwendet (s. Abbildung 8.4 im Anhang).

Während der Tumorbildung entstehen neue Blutgefäße zur Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und um weiteres Wachstum zu ermöglichen. Obwohl die Tumorgewichte bei beiden Gruppen mit DETA-NO leicht höher waren als mit NaCl, wurden weniger CD31-positive Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Ebenfalls konnte eine leicht reduzierte Fläche an Ki-67-positiven Zellen ermittelt werden (vgl. Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass in den mit DETA-NO behandelten Tumoren weniger lebensfähige Zellen sind und daher auch weniger proliferieren (Schwab et al. 2012). *In vitro* Versuche haben ebenfalls gezeigt, dass durch NO das Zellwachstum und die Proliferation gehemmt wird und die Apoptose induziert werden kann (Napoli et al. 2013).

Eine HIF-1 $\alpha$ -Überexpression in Mammakarzinomen wurde in der Literatur zum einen direkt im Bereich nekrotischer Anteile aber auch in perinekrotischen Arealen des Tumors lokalisiert. Während die direkt im Bereich der Nekrose liegende diffuse Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  mit fehlender Überexpression von HIF-1-Zielgenen einhergeht, konnte bei der perinekrotischen (Hypoxie-induzierten) Überexpression eine Übereinstimmung mit der Überexpression von CAIX und GLUT1 festgestellt werden (Vleugel et al. 2006; Vleugel et al. 2005; R Bos et al. 2001). In dieser Arbeit konnte in den Tumoren der mit DETA-NO behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere eine gesteigerte mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$  ermittelt werden (vgl. Abbildung 4.8 A). Berchner-Pfannschmidt et al. (2010) konnten zeigen, dass die PHD2 durch NO gehemmt und

dadurch der Abbau von HIF-1 $\alpha$  verhindert wird (vgl. Abbildung 1.3 A), jedoch gilt dies nur auf Proteinebene. Da die molekularen Mechanismen in Bezug auf die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Stabilität noch nicht ausreichend erforscht sind, bietet die Arbeit von Kim et al. (2010) eine mögliche Erklärung dazu. Sie fanden heraus, dass das Tristetraprolin-Protein (TTP) ein Modulator der HIF-1 $\alpha$ -Expression während der Hypoxie ist und eine physiologische Rolle bei der Regulation der zellulären Anpassung und Apoptose bei längerer Hypoxie spielt. Darüber hinaus können Krebszellen aus der verminderten Expression von TTP und dadurch erhöhter HIF-1 $\alpha$ -Expression bei der Anpassung der Krebszellen gegenüber Hypoxie profitieren.

Im Einklang zu der vermehrten HIF-1 $\alpha$ -mRNA wurde auch eine erhöhte Expression der HIF-1-Zielgene GLUT1, PGK-1 und VEGF (vgl. Abbildung 4.10 C und Abbildung 4.11) und auf Proteinebene auch von CAIX (vgl. Abbildung 4.9 A/B) festgestellt. Dagegen konnte in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse unabhängig der Behandlung eine geringere mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$  und auch GLUT1 festgestellt werden. Für CAIX und PGK-1 konnte kein Einfluss des HIF-1 $\alpha$  auf die Expression nachgewiesen werden. Die VEGF-Expression zeigt sogar einen Anstieg in den HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäusen, vermutlich, weil sie durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert werden kann (Neufeld et al. 1999).

In der zellulären Antwort auf DNA-Schäden (*DDR, DNA-damage response*) stehen HIF-1 $\alpha$  und Brca1 in engem Zusammenhang. Brca1 spielt in der Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Reparatur eine wesentliche Rolle (Huen et al. 2010). HIF-1 $\alpha$  ist der Lage, die Brca1-Aktivität zu hemmen und damit einen Zellzyklusarrest zu verursachen (Koshiji et al. 2004), andererseits zeigten Kang et al. (2006) in Brustkrebszellen, dass Brca1 die Hypoxie-induzierte Stabilisation von HIF-1 $\alpha$  und die Expression des HIF-1 $\alpha$ -Zielgens VEGF steigert. In der vorliegenden Studie konnte in Zusammenhang mit der erhöhten HIF-1 $\alpha$ -Expression nur in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäusen mit DETA-NO eine leicht erhöhte Expression von Brca1 festgestellt werden (vgl. Abbildung 4.12 A). Möglicherweise steht die erhöhte VEGF-Expression (vgl. Abbildung 4.11 B) der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse in Zusammenhang mit dieser Brca1-Expression; dies haben auch Kawai et al (2002) in Zellkulturversuchen festgestellt.

Das Tumorsuppressorgen p53 spielt ebenfalls in der Zellzyklus-Steuerung während der Progression, aber auch bei der Induktion der Apoptose eine Rolle. In einigen

Brustkrebszelllinien konnte die inverse Beziehung zwischen dem Tumorsuppressorgen p53 und antiapoptotischem Bcl2 nachgewiesen werden. Bereits das normale Brustepithel, aus dem das Karzinom entsteht, exprimiert Bcl2, welches die Lebensdauer der Zellen verlängert und die genetische Veränderung zum Karzinom begünstigt (Crescenzi et al. 2003; Cory & Adams 2002; Basu & Haldar 1998; Hemann & Lowe 2006). Im Gegensatz zu Haldar et al. (1994), der eine durch p53 verminderte Expression von Bcl2 in Brustkrebszellen feststellte, konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Eine höhere Expression von p53 in Tumoren der mit DETA-NO-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäusen korrelierte mit einer höheren Expression von Bcl2 (vgl. Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13). Dies spricht für eine antiapoptotische Wirkung des NO innerhalb des Mammakarzinoms.

Die beiden Metalloproteinasen MMP2 und MMP9 sind auf Grund ihrer Rolle in der frühen Entwicklung und Progression von Tumoren von besonderem Interesse. Insbesondere diese beiden Proteinasen sind in der Lage, die extrazelluläre Matrix, die Hauptbarriere zwischen in situ und invasiven Karzinomen, abzubauen (Liotta et al. 1980; Duffy et al. 2000). MMP2 ist ein durch p53 kontrolliertes Zielgen (Bergers & Benjamin 2003) und fördert die Bildung anti-angiogener Peptide aus Basalmembranproteinen (Bian & Sun 1997). In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäuse konnte durch DETA-NO eine höhere Expression von MMP2 festgestellt werden. Dies lässt sich durch die Induktion von p53 erklären. Die Expression von MMP9 in DETA-NO-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäusen war ebenfalls erhöht, signifikant im Vergleich zu den mit NaCl-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäusen als auch zu beiden Gruppen der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse (vgl. Abbildung 4.14). Dies lässt sich dadurch erklären, dass MMP9 durch den Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1) induziert wird (Ebrahimian et al. 2012), seinerseits ein HIF- $\alpha$  Zielgen (H. Liao et al. 2007). Die vermehrte Expression von MMP2 und MMP9 steht im Zusammenhang mit vermehrten angiogenen Läsionen (Bergers et al. 2000), sodass in den mit DETA-NO-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäusen von einer fortgeschrittenen Angiogenese ausgegangen werden kann.

Die hier gezeigten Ergebnisse lassen keine Rückschlüsse auf pro- oder anti-tumorale Effekte von HIF-1 $\alpha$  direkt zu, aber die Gabe von NO bei HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäusen zeigt einen deutlichen protumoralen Effekt. So resultiert die Behandlung mit DETA-NO hier in einer gesteigerten mRNA-Expression von Brca1, dies führt zu einer HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung und zu einer

gesteigerten HIF-1 $\alpha$ -Zielgenexpression, wie z.B. VEGF, GLUT1, PGK1, MMP2 und -9. Dies sind Indizien dafür, dass sich der Tumor proangiogen entwickelt, unterstützt wird diese These auch durch das erhöhte Tumorgewicht bzw. -last.

### 5.2 Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts auf das Immunsystem

In diesem Abschnitt soll diskutiert werden, ob und wie der HIF-1 $\alpha$ -Knockout und durch die Behandlung mit DETA-NO Einfluss auf das Immunsystem nimmt. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass B- und T-Lymphozyten eine protumorale Aktivität aufweisen und durch indirekte Regelung der Bioaktivität von myeloiden Zellen, einschließlich Makrophagen, Monozyten und Mastzellen zu einer Resistenz gegen Therapien und Entwicklung von Metastasen führt (Andreu et al. 2010; De Visser et al. 2005). Wie DeNardo et al. (2009) zeigten, resultiert ein höheres Metastasierungsverhalten in Mammaadenokarzinomen in Abwesenheit einer signifikanten zytotoxischen T-Zellantwort durch T-Helferzellen, die direkt die protumorale Bioaktivität von tumor-assoziierten Makrophagen erhöhen. Daher postulierten DeNardo et al. (2011), dass Brustkrebspatienten mit einem Immunprofil, welches durch einen niedrigen Anteil an Makrophagen und T-Helferzellen, sowie einen hohen Anteil an zytotoxischen T-Zellen charakterisiert ist, durch lokale Resektion eine verbesserte und rezidivfreie Überlebensrate haben. Im Gegenteil dazu stellt eine Immunantwort mit einem hohen Makrophagen- und T-Helferzellen-Anteil sowie einem niedrigen Anteil an zytotoxischen T-Zellen ein Risiko für Fernmetastasen und geringer Überlebensrate dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl zwei Tumore pro Maus, als auch Lymphknoten und Milz durchflusszytometrisch auf Makrophagen, T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen hin untersucht. In den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{\text{MEC-/-}}$ -Mäuse konnten unabhängig der Behandlung weniger Makrophagen, unter DETA-NO Einfluss sogar auffällig wenig aktivierte Makrophagen, detektiert werden als in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse. Da, wie bereits erwähnt, in allen Mäusen keine Lungenmetastasen, aufgrund des genetischen Hintergrundes oder Alters der Mäuse, vorhanden waren, und auch der Beginn des Tumorwachstums sowie die Tumorgewichte annähernd gleich waren, kann davon ausgegangen werden, dass die

tumorinfiltrierten Immunzellen wie auch die Gabe von DETA-NO eher eine untergeordnete Rolle spielen (vgl. Abbildung 4.17 und Abbildung 4.19). Auch die Immunzellinfiltrate der sekundären lymphatischen Organe konnten nicht zur Aufklärung des Einflusses von HIF-1 $\alpha$  auf das Immunsystem und das Tumorstadium beitragen. Auffällig waren hier die im Gegensatz zu den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäusen (NaCl) die niedrigen Infiltrationsraten von T-Helferzellen sowohl in der Milz also auch in Lymphknoten der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse (DETA-NO) sowie in den beiden Gruppen der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse (vgl. Abbildung 4.22 A/B und Abbildung 4.25 A/B). In der Literatur konnte hierzu keine Erklärung gefunden werden.

Sowohl in den Tumoren als auch in Milz und Lymphknoten der HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse wurden mehr NK Zellen gefunden als in HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (vgl. Abbildung 4.21, Abbildung 4.24). Dies spricht für eine HIF-1 $\alpha$ -abhängige Hemmung der NK-Zell-Rekrutierung. Dies fanden auch Sun et al. (2001) mit einer Antisense-HIF-1 $\alpha$ -Therapie heraus. Durch die Antisense-HIF-1 $\alpha$ -Therapie wird die Expression von HIF-1 $\alpha$  gezielt geschwächt bzw. ganz abgeschaltet, was in der Arbeit von Sun zu einer Erhöhung der NK-Zellen führte. Da in Anwesenheit von HIF-1 $\alpha$  angiogene Faktoren die Adhäsion von NK-Zellen an das Endothel sowohl fördern als auch hemmen können, ist es laut Sun möglich, dass eine Antisense-Therapie das Gleichgewicht zugunsten der NK-Zelladhäsion an die Tumorgefäße verschiebt und die antitumorale zytotoxische Wirkung ausgelöst wird (Kim et al. 2000; Langers et al. 2012; Cheng et al. 2013).

## 6 Zusammenfassung

Die Anpassung an Hypoxie, die in schnell wachsendem Tumorgewebe durch Mangel durchblutung und Sauerstoffunterversorgung entsteht, wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktorkomplex Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1) reguliert. Prolylhydroxylasen (PHDs) kontrollieren den Gehalt der Untereinheit HIF-1 $\alpha$ , welche entscheidend für die Aktivität und Zielgenexpression von HIF-1 ist. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an PHD2 sowie die Aktivität durch Stickstoffmonoxid beeinflusst werden können. In einem autochthonen Mausmodell, welches spontan Mammatumore entwickelt, sollte der Einfluss von NO und HIF auf das Tumorstadium untersucht werden. Dieses Modell ist in der Literatur bekannt für die Entwicklung von soliden Tumoren und Metastasen in den Lungen.

Der HIF-1 $\alpha$ -Knockout in den Brustepithelzellen beeinflusste nicht den Beginn des Tumorstadiums, und phänotypisch konnte kein signifikanter Unterschied in den Tumorgewichten am Endzeitpunkt festgestellt werden. Durch die Injektionen des NO-Donors DETA-NO wurden die Tumorgewichte tendenziell erhöht. Des Weiteren wurden keine Lungenmetastasen festgestellt, was zu einem mit den genetischen Hintergrund der Mäuse zusammenhängen kann oder aber mit dem Alter beim Endzeitpunkt. Der HIF-1 $\alpha$ -Knockout führte zwar zu einer verminderten Expression von HIF-1 $\alpha$  und typischen Zielgenen wie Glucosetransporter 1 und Phosphoglyceratkinase 1 sowie den Entzündungsfaktoren Cyclooxygenase 2 und FOXP3, aber zum hier gewählten Endzeitpunkt konnten keine Unterschiede in der Tumorentwicklung bezüglich der Blutgefäßentwicklung und der Proliferationsrate festgestellt werden. In den Tumoren der Wildtyp-Mäuse konnte eine vermehrte Expression der oben genannten Gene unter Behandlung mit DETA-NO gemessen werden. Dies spricht zumindest dafür, dass die gewählte Dosis von DETA-NO die Tumorzellen erreicht und HIF-1 $\alpha$  und PHD2 durch NO in der Aktivität beeinflusst werden.

Die Untersuchung der infiltrierten Immunzellen in Tumoren und sekundären lymphatischen Organe konnte nicht zur Aufklärung der Rolle von NO und HIF auf das Tumorstadium beitragen. Es konnte zwar eine vermehrte Anzahl an NK-Zellen in den Tumoren,



Lymphknoten und Milz der Knockout-Mäuse festgestellt werden, was aber zu dem Endpunkt keinerlei Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf hatte.

Dieses Mausmodell bietet im Vergleich zu anderen Xenograft-Modellen sicherlich Vorteile hinsichtlich des intakten Immunsystems und des autochthonen Tumorwachstums, was mit der humanen Tumorentwicklung durchaus vergleichbar ist. Dennoch bringt es auch eine hohe Varianz der Tumorentwicklung aufgrund des genetischen Hintergrundes mit sich. Ob eine höhere Endzahl der Versuchstiere eindeutige Ergebnisse liefern würde, ist ebenso fraglich, da Vorversuche mit höherer Endzahl auch zu keinen signifikanten phänotypischen Unterschieden führten.

### **Summary**

The adaptation to hypoxia, resulting in fast-growing tumor tissue from insufficient perfusion, is mainly regulated by the transcription factor complex hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). Prolyl hydroxylases (PHDs) control the content of the subunit HIF-1 $\alpha$ , which is crucial for the activity and target gene expression of HIF-1. *In vitro* experiments showed, that the level and activity of PHD2 can be affected by nitric oxide (NO). To investigate the influence of HIF-1 $\alpha$  in tumors upon exposure of NO we used an autochthonous mouse model, which spontaneously develops mammary tumors. This model is known in the literature for the development of solid tumors and lung metastases. We used mice with a tumor cell-specific knockout of HIF-1 $\alpha$  and mice whose tumor cells expressing HIF-1 $\alpha$  as control.

The HIF-1 $\alpha$  knockout in the mammary epithelial cells did not affect the tumor onset and no significant differences in tumor weights were determined within both mice strains at the endpoint. In both mice strains a tendency to higher tumor weights caused by the NO donor DETA-NO could be observed. Furthermore, no lung metastases were detected which may be explained by the genetic background of the mice or may be associated with the age at endpoint. Still, the HIF-1 $\alpha$  knockout resulted in a reduced expression of HIF-1 $\alpha$  and in typical target genes such as glucose transporter 1 and phosphoglycerate kinase 1, as well as inflammation factors like cyclooxygenase 2 and FOXP3, but at the endpoint there were no differences in the development of tumors concerning blood vessel development and proliferation rate. In the tumors of wild-type mice, an increased expression of the genes

named above was measured under treatment with DETA-NO. This indicates at least that the selected dose of DETA-NO reached the tumor cells and HIF-1 $\alpha$  and PHD2 activity was affected by NO.

The study of the infiltrated immune cells in tumors and secondary lymphoid organs could not contribute to the elucidation of the role of NO and HIF on tumor growth. However, there was an increased number of NK cells in the tumors, lymph nodes and spleen in the knockout mice detected, but with no effect on disease progression at the endpoint.

This mouse model provides in comparison to other xenograft models certainly advantages in terms of the intact immune system and the autochthonous tumor growth, which is quite comparable with the human tumor development. However, it also appears to have a high variance of tumor development due to the genetic background. Whether a higher final number of animals would provide clearer results is also questionable since preliminary experiments with higher final number also resulted in no significant phenotypic differences.

## 7 Literaturverzeichnis

- Andreu, P. et al.**, 2010. FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer cell*, 17(2), pp.121–34.
- Arciero, D.M., Orville, A.M. & Lipscomb, J.D.**, 1985. [17O]Water and nitric oxide binding by protocatechuate 4,5-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase. Evidence for binding of exogenous ligands to the active site Fe<sup>2+</sup> of extradiol dioxygenases. *The Journal of biological chemistry*, 260(26), pp.14035–44.
- Armstrong, R.**, 2001. The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *International immunopharmacology*, 1(8), pp.1501–12.
- Arun, B. & Goss, P.**, 2004. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Seminars in oncology*, 31(2 Suppl 7), pp.22–9.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M.**, 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), pp.245–52.
- Barsoum, I.B. et al.**, 2011. Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide. *Cancer research*, 71(24), pp.7433–41.
- Basu, A. & Haldar, S.**, 1998. The relationship between Bcl2 , Bax and p53 : consequences for cell cycle progression and cell death. , 4(12), pp.1099–1109.
- Benjamin, L.E. et al.**, 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of clinical investigation*, 103(2), pp.159–65.
- Berchner-Pfannschmidt, U. et al.**, 2007. Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *The Journal of biological chemistry*, 282(3), pp.1788–96.
- Berchner-Pfannschmidt, U. et al.**, 2010. Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cellular signalling*, 22(3), pp.349–56.
- Bergers, G. et al.**, 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology*, 2(10), pp.737–44.
- Bergers, G. & Benjamin, L.E.**, 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer*, 3(6), pp.401–10.

- Bian, J. & Sun, Y.**, 1997. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Biol*, 17, pp.6330–6338.
- Bidri, M. et al.**, 2001. Mast cells as a source and target for nitric oxide. *International immunopharmacology*, 1(8), pp.1543–58.
- Bogdan, C., Rölinghoff, M. & Diefenbach, A.**, 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current opinion in immunology*, 12(1), pp.64–76.
- Bos, R. et al.**, 2001. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), pp.309–14.
- Brown, J.M.**, 2000. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Molecular Medicine Today*, 6(4), pp.157–162.
- Bruick, R.K.**, 2003. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes & development*, 17(21), pp.2614–23.
- Burke, A.J. et al.**, 2013. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis*, 34(3), pp.503–12.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K.**, 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), pp.249–57.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K.**, 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), pp.298–307.
- Carroll, V.A. & Ashcroft, M.**, 2005. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert reviews in molecular medicine*, 7(6), pp.1–16.
- Cheng, M. et al.**, 2013. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & molecular immunology*, 10(3), pp.230–52.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N.**, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), pp.156–159.
- Cifone, M.G., Ulisse, S. & Santoni, A.**, 2001. Natural killer cells and nitric oxide. *International Immunopharmacology*, 1(8), pp.1513–1524.
- Coleman, J.W.W.**, 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1(8), pp.1397–1406.
- Cory, S. & Adams, J.M.**, 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer*, 2(9), pp.647–56.

- Coussens, L.M., Zitvogel, L. & Palucka, a K.,** 2013. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science (New York, N.Y.)*, 339(6117), pp.286–91.
- Crescenzi, E., Palumbo, G. & Brady, H.J.,** 2003. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J*, 375, pp.263–274.
- DeNardo, D.G. et al.,** 2009. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, 16(2), pp.91–102.
- DeNardo, D.G. et al.,** 2011. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer discovery*, 1(1), pp.54–67.
- Duffy, M.J. et al.,** 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast cancer research : BCR*, 2(4), pp.252–7.
- Eastmond, N.C., Banks, E.M. & Coleman, J.W.,** 1997. Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN-gamma-induced suppression of exocytosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(3), pp.1444–50.
- Ebrahimian, T.G. et al.,** 2012. Plasminogen activator inhibitor-1 controls bone marrow-derived cells therapeutic effect through MMP9 signaling: role in physiological and pathological wound healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(7), pp.1436–46.
- Ellies, L.G. et al.,** 2003. Mammary tumor latency is increased in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 106(1), pp.1–7.
- Epstein, A.C. et al.,** 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), pp.43–54.
- Fernandez, N.C. et al.,** 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature medicine*, 5(4), pp.405–11.
- Folberg, R., Hendrix, M.J. & Maniotis, A.J.,** 2000. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *The American journal of pathology*, 156(2), pp.361–81.
- Folkman, J.,** 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 285(21), pp.1182–6.
- Folkman, J.,** 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, 82(1), pp.4–6.

- Forsythe, P. et al.**, 2001. Mast cells and nitric oxide: control of production, mechanisms of response. *International immunopharmacology*, 1(8), pp.1525–41.
- Frede, S., Berchner-Pfannschmidt, U. & Fandrey, J.**, 2007. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods in enzymology*, 435, pp.405–19.
- Fukumura, D., Kashiwagi, S. & Jain, R.K.**, 2006. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature reviews. Cancer*, 6(7), pp.521–34.
- Haldar, S. et al.**, 1994. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Research*, 54, pp.2095–2097.
- Hamerman, J.A., Ogasawara, K. & Lanier, L.L.**, 2005. NK cells in innate immunity. *Current opinion in immunology*, 17(1), pp.29–35.
- Hegg, E.L. & Jr, L.Q.**, 1997. The 2-His-1-Carboxylate Facial Triad - An Emerging Structural Motif in Mononuclear Non-Heme Iron(II) Enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 250(3), pp.625–629.
- Hemann, M.T. & Lowe, S.W.**, 2006. The p53-Bcl-2 connection. *Cell death and differentiation*, 13(8), pp.1256–9.
- Herbert, S.P. & Stainier, D.Y.R.**, 2011. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(9), pp.551–64.
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R. & Vavrin, Z.**, 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4787), pp.473–6.
- Hoskin, P.J. et al.**, 2003. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *British journal of cancer*, 89(7), pp.1290–7.
- Howe, L.R. et al.**, 2005. HER2/neu-induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice. *Cancer research*, 65(21), pp.10113–9.
- Huang, L.E. et al.**, 1999. Inhibition of Hypoxia-inducible Factor 1 Activation by Carbon Monoxide and Nitric Oxide: IMPLICATIONS FOR OXYGEN SENSING AND SIGNALING. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), pp.9038–44.
- Huang, L.E. et al.**, 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), pp.7987–92.

- Huerta, S., Chilka, S. & Bonavida, B.,** 2008. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics (Review). *International Journal of Oncology*, 33(5), pp.909–927.
- Hunter, K., Welch, D.R. & Liu, E.T.,** 2003. Genetic background is an important determinant of metastatic potential. *Nature genetics*, 34(1), pp.23–4; author reply 25.
- Ivan, M. et al.,** 2001. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516), pp.464–8.
- Jaakkola, P. et al.,** 2001. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516), pp.468–72.
- Jain, R.K.,** 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine*, 9(6), pp.685–93.
- Jeong, J.W. et al.,** 2002. Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111(5), pp.709–20.
- Jiang, B.H. et al.,** 1996. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*, 271(30), pp.17771–8.
- Kalluri, R.,** 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 3(6), pp.422–33.
- Kang, H.J. et al.,** 2006. BRCA1 plays a role in the hypoxic response by regulating HIF-1 $\alpha$  stability and by modulating vascular endothelial growth factor expression. *The Journal of biological chemistry*, 281(19), pp.13047–56.
- Kawai, H. et al.,** 2002. Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene*, 21(50), pp.7730–9.
- Kim, S. et al.,** 2000. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp.2731–2736.
- Kim, T.W. et al.,** 2010. Tristetraprolin regulates the stability of HIF-1 $\alpha$  mRNA during prolonged hypoxia. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(1), pp.963–8.
- Kimura, H. et al.,** 2000. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*, 95(1), pp.189–97.

- Knowles, R.G. & Moncada, S.**, 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal*, 298, pp.249–58.
- Kröncke, K.D. et al.**, 2001. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *International immunopharmacology*, 1(8), pp.1407–20.
- Lando, D. et al.**, 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development*, 16(12), pp.1466–1471.
- Langers, I. et al.**, 2012. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics : targets & therapy*, 6, pp.73–82.
- Langrehr, J.M. et al.**, 1993. Nitric oxide--a new endogenous immunomodulator. *Transplantation*, 55(6), pp.1205–12.
- Lanza-Jacoby, S. et al.**, 2003. The cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, prevents the development of mammary tumors in Her-2/neu mice. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 12(12), pp.1486–91.
- Lendeckel, U. et al.**, 2005. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 131(1), pp.41–8.
- Liao, D. et al.**, 2007. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer research*, 67(2), pp.563–72.
- Liao, H. et al.**, 2007. Molecular regulation of the PAI-1 gene by hypoxia: contributions of Egr-1, HIF-1alpha, and C/EBPalpha. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21, pp.935–949.
- Liew, F.Y. et al.**, 1991. Resistance to Leishmania major infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *European journal of immunology*, 21(12), pp.3009–14.
- Lin, E.Y. et al.**, 2006. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Research*, 66(23), pp.11238–11246.
- Lin, E.Y. et al.**, 2003. Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases. *The American journal of pathology*, 163(5), pp.2113–2126.



- Liotta, L.A. et al.**, 1980. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 284(5751), pp.67–68.
- Liu, C.H. et al.**, 2001. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 276(21), pp.18563–9.
- Liu, Y. et al.**, 1998. Carbon Monoxide and Nitric Oxide Suppress the Hypoxic Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Gene via the 5' Enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), pp.15257–62.
- Lou, Y. et al.**, 2011. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer research*, 71(9), pp.3364–76.
- Mahon, P.C., Hirota, K. & Semenza, G.L.**, 2001. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & development*, 15(20), pp.2675–86.
- Masson, N. et al.**, 2001. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *The EMBO journal*, 20(18), pp.5197–206.
- Maxwell, P.H. et al.**, 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), pp.271–5.
- McDonald, D.M. & Choyke, P.L.**, 2003. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nature medicine*, 9(6), pp.713–25.
- McDonald, D.M., Munn, L. & Jain, R.K.**, 2000. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *The American journal of pathology*, 156(2), pp.383–8.
- McDougall, S.R., Anderson, A.R.A. & Chaplain, M.A.J.**, 2006. Mathematical modelling of dynamic adaptive tumour-induced angiogenesis: clinical implications and therapeutic targeting strategies. *Journal of theoretical biology*, 241(3), pp.564–89.
- Metzen, E. et al.**, 2003. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 $\alpha$  by inhibition of prolyl hydroxylases. S. Pfeffer, ed. *Molecular Biology of the Cell*, 14(8), pp.3470–3481.
- Moncada, S. & Higgs, A.**, 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine*, 329(27), pp.2002–12.
- Morikawa, S. et al.**, 2002. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *The American journal of pathology*, 160(3), pp.985–1000.

- Napoli, C. et al.**, 2013. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(2), pp.89–95.
- Neufeld, G. et al.**, 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13, pp.9–22.
- Ohh, M. et al.**, 2000. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature cell biology*, 2(7), pp.423–7.
- Onizuka, S. et al.**, 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer research*, 59(13), pp.3128–33.
- Palmer, L.A., Gaston, B. & Johns, R.A.**, 2000. Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Molecular pharmacology*, 58(6), pp.1197–203.
- Pardoll, D.M. & Topalian, S.L.**, 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Current opinion in immunology*, 10(5), pp.588–94.
- Park, Y.-K. et al.**, 2008. Nitric oxide donor, (+/-)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine, stabilizes transactive hypoxia-inducible factor-1alpha by inhibiting von Hippel-Lindau recruitment and asparagine hydroxylation. *Molecular pharmacology*, 74(1), pp.236–45.
- Potter, C. & Harris, A.L.**, 2004. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 3(2), pp.164–7.
- Raulet, D.H.**, 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nature immunology*, 5(10), pp.996–1002.
- Risau, W. & Flamme, I.**, 1995. Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 11, pp.73–91.
- Roach, P.L. et al.**, 1995. Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature*, 375(6533), pp.700–4.
- Robbins, R.A. et al.**, 1994. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 203(1), pp.209–18.
- Ryan, H.E. et al.**, 2000. Hypoxia-inducible factor-1a is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Research*, 60(15), pp.4010–4015.
- Sandau, K.B., Fandrey, J. & Brüne, B.**, 2001. Accumulation of HIF-1a under the influence of nitric oxide. *Blood*, 97(4), pp.1009–1015.

- Schelter, F. et al.**, 2010. Identification of a survival-independent metastasis-enhancing role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  with a hypoxia-tolerant tumor cell line. *The Journal of biological chemistry*, 285(34), pp.26182–9.
- Schofield, C.J. & Ratcliffe, P.J.**, 2004. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(5), pp.343–54.
- Schwab, L.P. et al.**, 2012. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast cancer research BCR*, 14(1), p.R6.
- Semenza, G.L.**, 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), pp.399–408.
- Semenza, G.L.**, 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), pp.721–32.
- Shimizu, J., Yamazaki, S. & Sakaguchi, S.**, 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(10), pp.5211–8.
- Shimizu, K. et al.**, 2010. Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 5(5), pp.585–90.
- Sogawa, K. et al.**, 1998. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), pp.7368–73.
- Stockmann, C. et al.**, 2008. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*, 456(7223), pp.814–8.
- Stockmann, C. & Fandrey, J.**, 2006. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 33(10), pp.968–79.
- Sun, X. et al.**, 2001. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene therapy*, 8(8), pp.638–45.
- Tanchot, C. et al.**, 2013. Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 6(2), pp.147–57.

- Taylor-Robinson, A.W. et al.**, 1994. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *European journal of immunology*, 24(4), pp.980–4.
- Thiry, A. et al.**, 2006. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences*, 27(11), pp.566–73.
- Tuominen, V.J. et al.**, 2010. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast cancer research : BCR*, 12(4), p.R56.
- Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P.**, 1989. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research*, 49(23), pp.6449–65.
- Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M.**, 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), pp.440–2.
- Van der Veen, R.C.**, 2001. Nitric oxide and T helper cell immunity. *International immunopharmacology*, 1(8), pp.1491–500.
- De Visser, K.E., Eichten, A. & Coussens, L.M.**, 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 6(1), pp.24–37.
- De Visser, K.E., Korets, L. V & Coussens, L.M.**, 2005. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, 7(5), pp.411–423.
- Vleugel, M.M. et al.**, 2005. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 $\alpha$  expression in invasive breast cancer. *Journal of clinical pathology*, 58(2), pp.172–7.
- Vleugel, M.M. et al.**, 2006. p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer. *Human pathology*, 37(8), pp.1085–92.
- Wang, G.L. et al.**, 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), pp.5510–4.
- Wei, X.Q. et al.**, 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 375(6530), pp.408–11.
- Yasuda, H. et al.**, 2006. Nitroglycerin treatment may enhance chemosensitivity to docetaxel and carboplatin in patients with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(22), pp.6748–57.

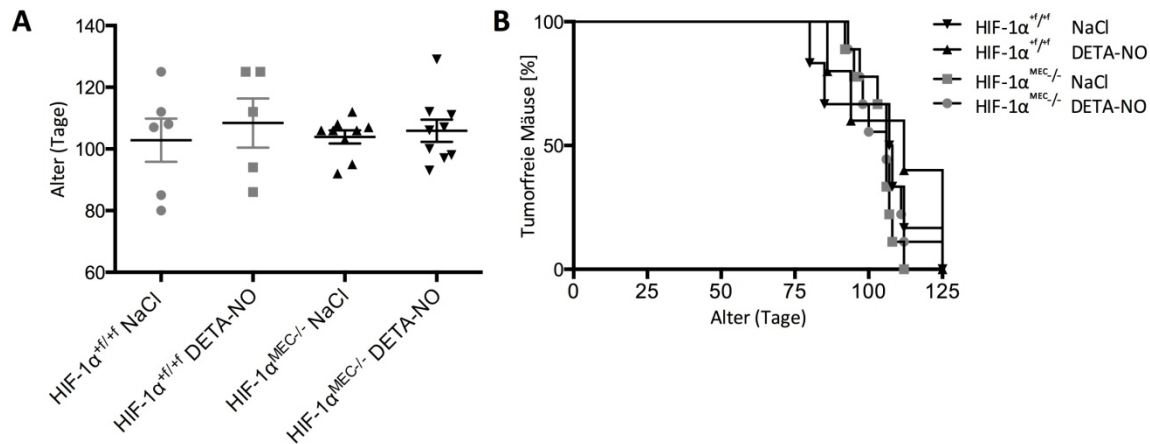
## 8 Anhang

### 8.1 Versuchsreihe mit 10 mg/kg KG DETA-NO

Die ersten Tumore sind in etwa ab einem Alter von 10 Wochen durch Abtasten der Brustdrüsen nachweisbar und wachsen danach zu makroskopischen Tumoren heran. HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse der 3. Generation erhielten ab der 8. Lebenswoche jeden dritten Tag eine intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg KG DETA-NO oder NaCl als Kontrolle. Die maligne Tumorentwicklung und die Lungenmetastasierung finden zwischen der 16. und 20. Lebenswoche statt, der Endpunkt dieser Studie wurde daher auf 20 Wochen festgesetzt (D. Liao et al. 2007; Stockmann et al. 2008).

#### 8.1.1 Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts und 10 mg/kg KG DETA-NO auf den Beginn des Tumorwachstums

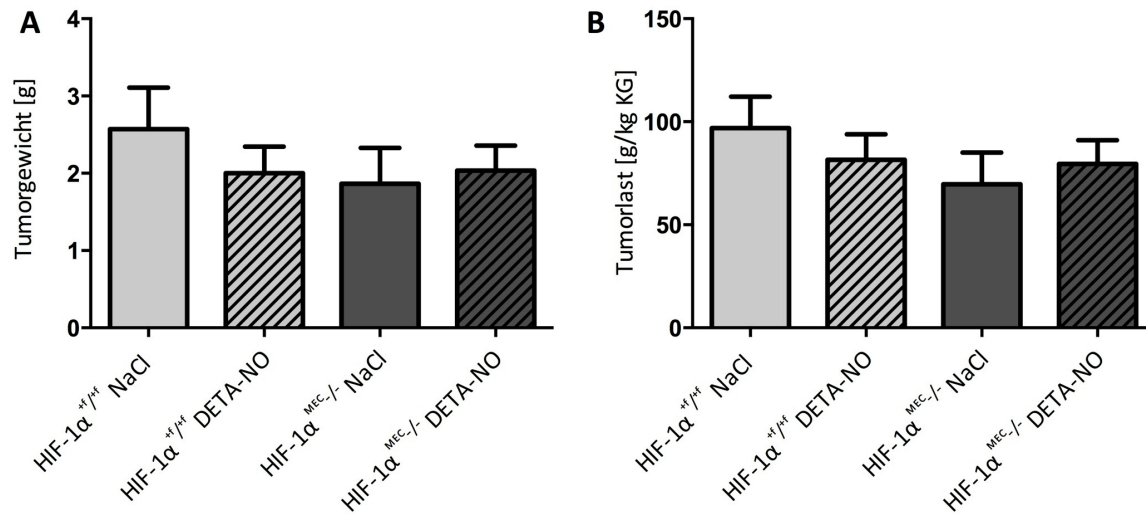
Der Beginn des Tumorwachstums wurde durch Palpation der Brustdrüsen festgestellt. Alle Versuchstiere entwickelten aufgrund des PyMT-Gens Brusttumore in einem Zeitraum von 80-129 Lebenstagen spontan autochthone Brusttumore. Der HIF-1 $\alpha$ -Knockout im Brustepithel hatte keinen Einfluss auf den Beginn des Tumorwachstums. Die Behandlung mit 10 mg/kg DETA-NO führte jedoch tendenziell zu einem späteren Wachstumsbeginn. In der Gruppe der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere begann das Wachstum 5 Tage später, bei den HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Tieren bestand ein um 2 Tage verzögerter Wachstumsbeginn. Die Kaplan-Meier-Analyse des tumorfreien Intervalls ergab die Behandlung mit DETA-NO in der Gruppe der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere einen Unterschied von 4 Tagen, die HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Tiere wiesen keinen Unterschied (jeweils 106 Tage) auf.



**Abbildung 8.1: HIF-1 $\alpha$ -Knockout und Behandlung mit 10 mg/kg KG DETA-NO haben keinen Einfluss auf den Beginn des Tumorwachstums.** A: Mittleres Alter bei Tumorwachstumsbeginn: HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl = 103 Tage (n = 6), HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO = 108 Tage (n = 5), HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  NaCl = 104 Tage (n = 9), HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  DETA-NO = 106 Tage (n = 9), Mittelwerte  $\pm$  SEM. B: Kaplan-Meier-Analyse des tumorfreien Intervalls: HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl = 108 Tage (n = 6), HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO = 112 Tage (n = 5), HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  NaCl = 106 Tage (n = 9), HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  DETA-NO = 106 Tage (n = 9).

### 8.1.2 Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts und 10 mg/kg KG DETA-NO auf das Tumorgewicht

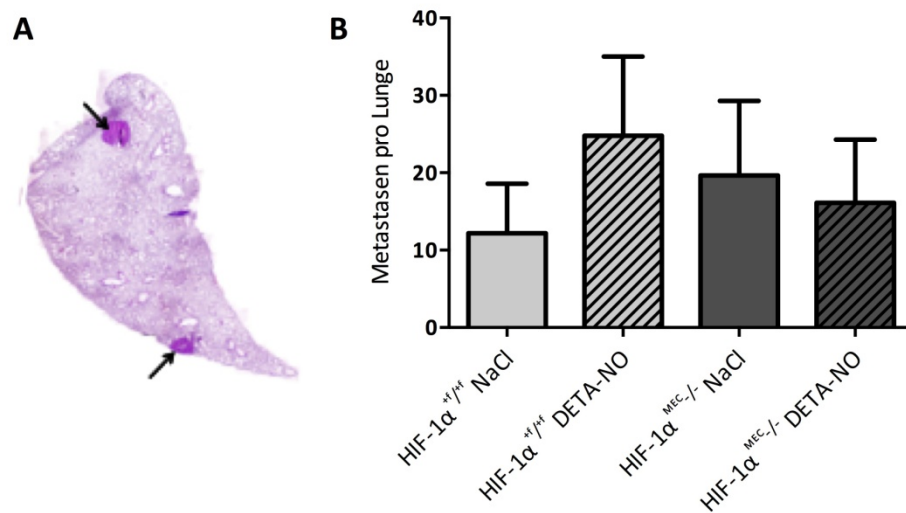
Die Mäuse erhielten über einen Zeitraum von 12 Wochen alle drei Tage eine intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg KG DETA-NO oder NaCl. Mit einem Alter von 20 Wochen wurden bis zu zehn Tumore pro Maus nach zervikaler Dislokation entnommen und gewogen. Abbildung 8.2 A zeigt das Gesamtgewicht aller entnommen Tumore; B die Tumorlast pro kg Körpergewicht [KG]. Die HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäuse hatten im Vergleich zu den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäusen ein niedrigeres Tumorgewicht bzw. -last. Die Behandlung mit DETA-NO führte in den beiden Gruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen: Die HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse wiesen durch die Behandlung weniger Tumorgewicht bzw. -last im Gegensatz zu der NaCl-Gruppe auf, während die DETA-NO-Injektionen bei den HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$ -Mäusen auf ein höheres Tumorgewicht bzw. -last hindeutet.



**Abbildung 8.2: Tumorgewicht und Tumorlast in HIF-1α<sup>+/+</sup>-und HIF-1α<sup>MEC-/-</sup>-Mäusen nach 20 Wochen und Injektionen von 10 mg/kg KG DETA-NO.** A: Tumorgewicht [g] aller Tumore pro Maus. B: Tumorlast [g/kg KG] aller Tumore pro Maus bezogen auf kg Körpergewicht [KG]. HIF-1α<sup>+/+</sup> NaCl: n = 6, HIF-1α<sup>+/+</sup> DETA-NO: n = 5, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> NaCl: n = 9, HIF-1α<sup>MEC-/-</sup> DETA-NO: n = 9, Mittelwerte ± SEM.

### 8.1.3 Einfluss des HIF-1 $\alpha$ -Knockouts und DETA-NO auf die Metastasierung in den Lungen

Die Quantifizierung der Metastasen erfolgte an H & E-gefärbten Serienschritten der Lunge. Die HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Kontrolltiere wiesen im Gegensatz zu den mit DETA-NO behandelten Tieren um die Hälfte weniger Metastasen in der Lunge auf. Die HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Kontrolltieren entwickelten jedoch weniger Metastasen als die mit DETA-NO behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Mäuse.



**Abbildung 8.3: Quantifizierung der Lungenmetastasen.** A: Repräsentativer H & E-gefärbter Lungenflügel mit Metastasen (schwarze Pfeile). B: Quantifizierung der Metastasen pro Lunge. HIF-1 $\alpha^{+/+}$  NaCl: n = 6, HIF-1 $\alpha^{+/+}$  DETA-NO: n = 5, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  NaCl: n = 9, HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$  NaCl: n = 9, Mittelwerte  $\pm$  SEM.



#### 8.1.4 Abbildung einer Maus mit Tumoren

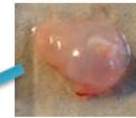
HIF-1 $\alpha^{MEC/-}$  #627

Tumorgewicht: 2.495 g

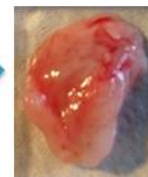
Tumorlast: 89.65 g/kg KG



Tumor 2/3  
0.695 g



Tumor 7  
0.266 g  
Ohne Flüssigkeit: 0.145g



Tumor 8  
0.647 g

Abbildung 8.4: Exemplarisches Beispiel für die unterschiedliche Morphologie von Tumoren einer Maus.

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

2-OG	2-Oxoglutarat
ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
ARD1	Acetyltransferase
Bcl2	<i>B-cell-lymphoma 2</i>
CAD	C-terminale transaktivierende Domäne
CAIX	Carboanhydrase IX
CD	Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (Cluster of Differentiation)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COX2	Cyclooxygenase 2
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DCs	Dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GLUT	Glukosetransporter
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor ( <i>hypoxia inducible factor</i> )
HRE	Hypoxie-responsives-Element
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
i. p.	intraperitoneal
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KO	Knockout
KG	Körpergewicht
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMTV	Maus-Mammatumovirus ( <i>Mouse mammary tumor virus</i> )

mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NAD	N-terminale transaktivierende Domäne
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
ODDD	<i>Oxygen-Dependent-Degradation</i> -Domäne
p53	Tumorsuppressor-Protein 53
PGK	Phosphoglyceratkinase
PHD	Prolylhydroxylasen
PyMT	<i>Polyoma middle T-antigen</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von-Hippel-Lindau
vSMCs	<i>vascular smooth muscle cells</i>
WT	Wildtyp

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur von HIF-1 $\alpha$ und HIF-1 $\beta$ . ....	2
Abbildung 1.2: HIF-1 $\alpha$ -Regulation durch Prolylhydroxylierung. ....	3
Abbildung 1.3: Bimodaler Effekt von NO auf den Sauerstoffsensor PHD2. ....	5
Abbildung 1.4: Neubildung von Blutgefäßen. ....	7
Abbildung 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines normalen und tumorösen Blutgefäßgeflechts. ....	8
Abbildung 1.6: Gefäßneubildung im Tumor – <i>angiogenic switch</i> . ....	10
Abbildung 1.7: Mechanismen von NO in einem Tumor. ....	12
Abbildung 1.8: Zusammenspiel angeborener und adaptiver Immunzellen während der Tumorentwicklung. ....	14
Abbildung 4.1: Signifikante Knockout-Effizienz in Tumoren von HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ - und HIF-1 $\alpha^{MEC/-/-}$ -Mäusen. ....	36
Abbildung 4.5: Behandlung mit 80 mg/kg KG DETA-NO resultiert in höherem Tumorgewicht. ....	40
Abbildung 4.6: DETA-NO behandelte Tumore proliferieren weniger. ....	41
Abbildung 4.7: Behandlung mit DETA-NO führte tendenziell zu einer geringeren Ausbildung von Blutgefäßen. ....	43
Abbildung 4.8: Anstieg der HIF-1 $\alpha$ - und PHD2-mRNA-Expression unter DETA-NO-Einfluss in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ -Mäusen. ....	45
Abbildung 4.9: Weniger CAIX-Protein HIF-1 $\alpha^{MEC/-/-}$ -Tumoren. ....	47
Abbildung 4.10: Vergleichbarer Proteingehalt an GLUT1 in Tumoren, aber deutlich reduzierte mRNA-Expression in den Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC/-/-}$ -Mäuse. ....	49
Abbildung 4.11: PKG-1 wird in den HIF-1 $\alpha^{MEC/-/-}$ -Tumoren weniger exprimiert. ....	50
Abbildung 4.12: Gesteigerte Brca1-Genexpression unter NO-Einfluss und erhöhte p53-Expression in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ -Mäuse. ....	51
Abbildung 4.13: Bcl2-Expression in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC/-/-}$ -Mäuse geringer als in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ -Mäuse. ....	52
Abbildung 4.14: DETA-NO erhöht die Expression von MMP2 und MMP9 in HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ -Mäusen. ....	53

Abbildung 4.15: Gesteigerte Expression von ADAM10 in Tumoren der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Mäuse durch DETA-NO. ....	54
Abbildung 4.16: Erhöhte Expression von COX2 und FOXP3 in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tumoren mit DETA-NO. ....	55
Abbildung 4.17: Durchflusszytometrische Bestimmung der Immunzellinfiltrate des angeborenen Immunsystems in Tumoren. ....	57
Abbildung 4.18: In Tumoren der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse tendenziell mehr NK-Zellen. ....	58
Abbildung 4.19: Durchflusszytometrische Bestimmung der Immunzellinfiltrate des adaptiven Immunsystems in Tumoren. ....	60
Abbildung 4.20: Zellen des angeborenen Immunsystems in den regionalen Lymphknoten. ....	63
Abbildung 4.21: Erhöhte NK-Zellen Infiltration in den Lymphknoten der HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäuse. ....	64
Abbildung 4.22: Zellinfiltrate des adaptiven Immunsystems im Lymphknoten. ....	65
Abbildung 4.23: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellinfiltrate des angeborenen Immunsystems in der Milz. ....	67
Abbildung 4.24: DETA-NO vermindert die Einwanderung von NK-Zellen in die Milz. ....	68
Abbildung 4.25: Zellen des adaptiven Immunsystems in der Milz. ....	69
Abbildung 8.1: HIF-1 $\alpha$ -Knockout und Behandlung mit 10 mg/kg KG DETA-NO haben keinen Einfluss auf den Beginn des Tumorwachstums. ....	92
Abbildung 8.2: Tumorgewicht und Tumorlast in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -und HIF-1 $\alpha^{MEC-/-}$ -Mäusen nach 20 Wochen und Injektionen von 10 mg/kg KG DETA-NO. ....	93
Abbildung 8.4: Exemplarisches Beispiel für die unterschiedliche Morphologie von Tumoren einer Maus. ....	95

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Pro- und antiangiogene Faktoren.....	9
Tabelle 3.1: Verwendete Geräte und Hersteller.....	17
Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 3.3: Verwendete Chemikalien.....	19
Tabelle 3.4: Puffer und Medien.....	21
Tabelle 3.5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....	21
Tabelle 3.6: Reagenzien und Enzyme für die cDNA-Synthese, PCR und Real-Time PCR.....	22
Tabelle 3.8: Auflistung verwendeter kommerzieller Kits.....	24
Tabelle 3.9: Ansatz für die Genotypisierungs-PCR.....	26
Tabelle 3.10: Ansatz für den RT-Mastermix zur cDNA-Synthese.....	28
Tabelle 3.11: Ansatz für den PCR-Mastermix.....	29
Tabelle 3.12: Exemplarisches PCR-Programm.....	29
Tabelle 3.14: Beispiel eines Realtime-PCR-Programms zur Quantifizierung der Genexpression. .....	30
Tabelle 3.15: Immunhistochemische Färbungen: Antikörper und Methoden.....	34

## 8.5 Publikationsliste

**Pientka, F.K., Hu, J., Schindler, S. G., Brix, B., Thiel, A., Jöhren, O., Fandrey, J., Berchner-Pfannschmidt, U., Depping, R.** (2012). Oxygen sensing by the prolyl-4-hydroxylase PHD2 within the nuclear compartment and the influence of compartmentalisation on HIF-1 signalling. *Journal of cell science*, 125, pp.5168–76.

### Kongressbeiträge

**Thiel, A., Stockmann, C., Berchner-Pfannschmidt, U., Fandrey, J., Scheerer, N.** (2011). Effekte von Stickstoffmonoxid auf das Sauerstoffsensing in orthotopen Mammatumoren. Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen. (Poster)

**Thiel, A., Neugenauer, A., Stockmann, C., Berchner-Pfannschmidt, U., Scheerer, N., Fandrey, J.** (2012). Modulation of oxygen sensing by nitric oxide in an autochthonous mouse model of breast cancer. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden. (Poster)

**Thiel, A., Neugenauer, A., Stockmann, C., Berchner-Pfannschmidt, U., Fandrey, J.** (2012). *In vivo* effects of NO-dependent modulation of oxygen sensing in an autochthonous mouse model of breast cancer. 9th International Luebeck EPO Conference, Lübeck. (Poster)

**Thiel, A., Neugenauer, A., Stockmann, C., Berchner-Pfannschmidt, U., Fandrey, J.** (2013). *In vivo* effects of NO-dependent modulation of oxygen sensing in an autochthonous mouse model of breast cancer. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Heidelberg. (Poster)

## **8.6 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



## 8.7 Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik der Universität Duisburg-Essen (vom 04. Februar 2010) zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 11.12.2014

Anika Thiel

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik der Universität Duisburg-Essen (vom 04. Februar 2010) zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass ich diese Dissertation nur in diesem Verfahren eingereicht habe.

Essen, den 11.12.2014

Anika Thiel

## 8.8 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Joachim Fandrey für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis diese Promotionsarbeit durchführen zu können sowie für die interessante Themenstellung, wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Matthias Epple danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Resi und Mimi danke für die Freundschaft weit über das Labor hinaus und für die immerwährende Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Ich danke Agnes, die mir immer mit Rat und viel Tat bei den Mäuseversuchen und der Immunhisto beiseite stand.

Danke an die gesamte Arbeitsgruppe Fandrey, vor allem Claudia, Silke, Buena, Timm und André, Yvonne, Veronika und Katharina sowie Michael für die freundschaftliche Laboratmosphäre und viele wissenschaftliche und lustige nicht wissenschaftliche Gespräche.

Danken möchte ich auch den Ex-Stockis Katrin und Ralph, die mir immer hilfsbereit alle Fragen beantwortet haben und Anna für die lauten und lustigen Momente im Labor und darüber hinaus.

Kathrin möchte ich für die Freundschaft und täglichen Telefonate und gegenseitiges „wieder hochziehen“ und für all die schönen Jahre, die wir zusammen verbracht haben, danken.

Meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Oma und Tim danke ich für die langjährige Unterstützung und Motivation, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre mein Studium und diese Arbeit zu absolvieren.